

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA MATHIAS DÖLL BOSCARDIN

AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Eucalyptus benthamii MAIDEN *et* CAMBAGE

CURITIBA
2012

PATRÍCIA MATHIAS DÖLL BOSCARDIN

AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Eucalyptus benthamii MAIDEN *et* CAMBAGE

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Tomoe Nakashima
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

CURITIBA
2012

Boscardin, Patricia Mathias Döll

Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de
Eucalyptus benthamii Maiden et Cambage/ Patricia Mathias Döll
Boscardin – Curitiba, 2012.

172 f.: il.

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima

Co-Orientador: Professor Dr. Paulo Vitor Farago

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná.

Inclui bibliografia

1. α -Pineno. 2. Cultura celular. 3. Edema de orelha. 4.
Reflorestamento. I. Nakashima, Tomoe. II. Farago, Paulo Vitor.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO

PATRICIA MATHIAS DÖLL BOSCARDIN

Título: **AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN et CABBAGE**


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos


Profª Drª Tomoe Nakashima
Orientadora/Presidente


Profª Drª Katia Sabrina Paludo
(Universidade Federal do Paraná)


Profª Drª Jane Manfron Budel
(Faculdades Integradas do Brasil - Unibrasil)


Profª Drª Marcia Thaís Pochapski
(Universidade Estadual de Ponta Grossa)


Profª Drª Rubiana Mara Mainardes
(Universidade Estadual do Centro-Oeste)

Curitiba, 17 de abril de 2012.

Dedico este trabalho ao meu pai, Manfredo Döll (*in memoriam*).

Meu grande amigo e incentivador.

Acompanhou cada passo da minha vida em busca de crescimento pessoal.

Nunca “mediu esforços” para me proporcionar as melhores oportunidades de aprendizado intelectual e espiritual.

Colaborou plenamente na minha formação educacional.

Mostrou-me constantemente o caminho da retidão.

E sempre vibrou comigo a cada vitória.

Sem nunca deixar de me lembrar dos verdadeiros valores dessa vida.

Pai, essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por esta oportunidade de aprendizado e por ter colocado no meu caminho pessoas tão extraordinárias. A minha fé em Deus é que me permitiu chegar até aqui.

À minha querida e amada mãe, Maria Lídia Mathias Döll, exemplo de luta, dedicação e competência. Obrigada, mãe, por todo cuidado e amor a mim destinados. Obrigada por me acompanhar, me incentivar e estar presente em todas as etapas de meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao meu amado esposo, Rodrigo Boscardin, por todo carinho e amor que sempre dedicou a mim. Pela companhia constante, paciência infinita e por compreender a minha ausência em tantos momentos.

Aos meus irmãos, Karine Mathias Döll e Luciano Mathias Döll, que sempre me acompanharam e me incentivaram e pelos momentos maravilhosos de convivência e partilha.

À Professora Dra. Tomoe Nakashima por me orientar e oportunizar este aprendizado. Agradeço, especialmente, pela confiança, amizade e amor maternal que me ampararam durante as vicissitudes deste trabalho. Além de seus valiosos conhecimentos e ensinamentos durante esta caminhada.

Ao Professor Dr. Paulo Vitor Farago, pela orientação, confiança e atenção ilimitadas. Pela incansável dedicação em me orientar em busca do conhecimento e do sucesso profissional. Pela admirável paciência e imprescindível contribuição científica. E, principalmente, pela amizade absoluta e incondicional.

À Professora Dra. Carla Cristine Kanunfre, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que disponibilizou o Laboratório de Biologia Celular e seus preciosos conhecimentos a fim de me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, também, os sábios conselhos que me ampararam e guiaram durante tantos momentos.

À Professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade em me auxiliar com a cromatografia gasosa.

Ao Pesquisador Dr. Adilson Sartoratto, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, pelas análises de cromatografia gasosa.

Ao Professor Dr. Michel Fleith Otuki, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela doação da linhagem celular B16F10 e por oportunizar os ensaios da atividade anti-inflamatória.

Aos pós-graduandos de Farmacologia, da Universidade Federal do Paraná, Arthur Prudente e Daniel Mendes pelo auxílio com os ensaios da atividade anti-inflamatória.

À Professora Dra. Katia Sabrina Paludo, do Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela doação da linhagem celular HeLa e pelas sugestões e observações pertinentes no exame de qualificação deste trabalho.

À Professora Dra. Márcia Thaís Pochapski, do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelas importantes contribuições e sugestões no exame de qualificação deste trabalho.

Às Professoras Dra. Jane Manfron Budel, das Faculdades Integradas do Brasil, e Dra. Rubiana Mara Mainardes, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela participação na avaliação deste trabalho.

Aos taxonomistas Professor Dr. Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e Osmar dos Santos Ribas, do Museu Botânico Municipal, pela identificação da espécie.

Ao Dr. Paulo Eduardo Telles, da Embrapa Florestas, pela doação do material botânico.

À Professora Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo estímulo e incentivo constantes no desenvolvimento deste trabalho, além do carinho e da amizade sincera.

À minha querida amiga e colega de Doutorado, Débora Maria Borsato que me acompanha desde os tempos do Ensino Médio. Apesar de todas as dificuldades que enfrentamos juntas no desenvolvimento de nossos trabalhos, nunca deixamos de dar boas risadas e nos divertir com as coisas que nos aconteceram. Sempre conseguimos ver o lado bom de tudo que enfrentamos porque sempre estivemos juntas e assim nos amparamos.

Às colegas e amigas Sayonara Mendes e Stella Siu Ló pelo companheirismo e pela amizade.

Às minhas amigas e colegas do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Eliane May de Lima, Elise Tatiane Felipe, Juliana Souza Maestri, Laryssa Mendes, Lorena Becher e Simoní Marinéia Braatz. Meus experimentos se tornavam muito mais prazerosos quando vocês estavam no laboratório me ajudando, me emprestando algum material ou me contando algumas das incríveis histórias de vocês.

Aos meus queridos amigos e familiares pelo incentivo constante e pelos momentos de alegria e confraternização.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por permitir esta oportunidade de crescimento técnico-científico.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

“A sabedoria nos protege do mal.”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Eucalyptus benthamii Maiden et Cabbage é uma das espécies mais empregadas em regiões de reflorestamento no sul do Brasil. No entanto, investigações envolvendo aspectos fitoquímicos e farmacológicos do óleo essencial de *E. benthamii* são escassas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório e citotóxico do óleo volátil das folhas de *E. benthamii* e de alguns de seus terpenos constituintes. O material botânico foi coletado durante as quatro estações do ano de 2010 na Fazenda de Transferência de Tecnologia da Embrapa Florestas em Ponta Grossa, Paraná, Brasil. O óleo essencial de *E. benthamii* apresentou uma composição química diferenciada em relação a outras espécies de *Eucalyptus*, visto que não revelou a presença de 1,8-cineol (eucaliptol) e indicou uma concentração relativamente elevada de α -pineno. Com relação ao efeito anti-inflamatório, o óleo volátil em estudo acarretou a redução do edema de orelha em camundongos e a diminuição da infiltração leucocitária. O α -pineno refletiu a atividade anti-inflamatória do óleo essencial, porém a influência dos demais constituintes presentes na essência foi capaz de modular a atividade do composto majoritário. Embora o óleo essencial de *E. benthamii* tenha apresentado potencial para inibir a produção de óxido nítrico, seu composto majoritário, α -pineno, não demonstrou o mesmo efeito sobre os macrófagos peritoneais de camundongos. Considerando a atividade citotóxica sobre as quatro linhagens tumorais estudadas com base no ensaio do MTT, os óleos essenciais das folhas jovens e adultas de *E. benthamii* apresentaram melhores resultados que o α -pineno e o γ -terpineno, particularmente para as células Jurkat, HeLa e B16F10. Os resultados dos ensaios de liberação de lactato desidrogenase, conteúdo de DNA celular e fragmentação de DNA realizados com as células Jurkat, sugerem que as amostras em estudo podem induzir morte celular por apoptose.

Palavras-chave: α -Pineno. Cultura celular. Edema de orelha. Reflorestamento.

ABSTRACT

Eucalyptus benthamii Maiden et Cabbage is widely used for reforestation in South Brazil. However restricted data about phytochemical and pharmacological properties of the essential oil of *E. benthamii* are available. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory and cytotoxic potential of the volatile oil from leaves of *E. benthamii* and some related terpenes. The botanical material was collected during 2010 at Fazenda de Transferência de Tecnologia of Embrapa Florestas in Ponta Grossa, Paraná, Brazil. The essential oil of *E. benthamii* presented a particular chemical composition. It did not contain 1,8-cineole (eucalyptol) and showed a relatively high content of α -pinene. Considering the anti-inflammatory effect, the studied volatile oil provided a reduction of mice ear edema and decreased the leukocyte infiltration. The monoterpene α -pinene showed similar anti-inflammatory activity to essential oil. However the influence of other volatile compounds modulated its effect. Although the essential oil of *E. benthamii* had shown a potential to inhibit nitric oxide production, α -pinene did not reveal the same effect on mouse peritoneal macrophages. Regarding the cytotoxic activity on four tumor cell lines based on MTT assay, the essential oils from young and adult leaves of *E. benthamii* showed better results than α -pinene and γ -terpinene particularly for Jurkat, HeLa and B16F10 cell lines. The results of cytoplasmic lactate dehydrogenase activity, cell DNA content and DNA fragmentation carried out with Jurkat cells indicated that the cytotoxic activity of samples can involve pathways of inducing cell death by apoptosis.

Key words: α -Pinene. Cell culture. Ear edema. Reforestation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS TERPENOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO.....	35
FIGURA 02 -	ASPECTO GERAL DO HÁBITO DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CAMBAGE, MYRTACEAE.....	45
FIGURA 03 -	ASPECTO DAS FLORES DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CAMBAGE, MYRTACEAE.....	46
FIGURA 04 -	ASPECTO DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CAMBAGE, MYRTACEAE.....	49
FIGURA 05 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	66
FIGURA 06 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (3-15 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	67
FIGURA 07 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (21-33 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	67
FIGURA 08 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	68
FIGURA 09 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (3-15 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	69
FIGURA 10 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (21-33 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	69
FIGURA 11 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO.....	72
FIGURA 12 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO.....	73
FIGURA 13 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (23-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO.....	73
FIGURA 14 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	75
FIGURA 15 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	76
FIGURA 16 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (23-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	76

FIGURA 17 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	78
FIGURA 18 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	79
FIGURA 19 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (23-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	79
FIGURA 20 -	GRÁFICO DE SCORES DAS AMOSTRAS OEFJ VERÃO (2), OEFA VERÃO (1), OEFA OUTONO (3), OEFA INVERNO (4) E OEFA PRIMAVERA (5) A PARTIR DA SELEÇÃO DE DOIS COMPONENTES PRINCIPAIS.....	82
FIGURA 21 -	GRÁFICO DE LOADINGS DAS AMOSTRAS OEFJ VERÃO, OEFA VERÃO, OEFA OUTONO, OEFA INVERNO E OEFA PRIMAVERA A PARTIR DA SELEÇÃO DE DOIS COMPONENTES PRINCIPAIS.....	83
FIGURA 22 -	ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS APLICADA ÀS AMOSTRAS OEFJ VERÃO (2), OEFA VERÃO (1), OEFA OUTONO (3), OEFA INVERNO (4) E OEFA PRIMAVERA (4).....	84
FIGURA 23 -	EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS TOPICAMENTE COM O TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU A APLICAÇÃO APENAS DE ACETONA (VEÍCULO). NA SEQUÊNCIA, OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL (0,03 A 1 mg/ORELHA) E DEXAMETASONA (DEXA, 0,05 mg/ORELHA). AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM (N=5-8) DO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA EM MICRÔMETROS. ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE NEWMAN-KEULS. ### $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. * $P < 0,05$ E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE....	90
FIGURA 24 -	EFEITO DO α -PINENO NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS TOPICAMENTE COM O TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU A APLICAÇÃO APENAS DE ACETONA (VEÍCULO). NA SEQUÊNCIA, OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM O α -PINENO (0,1 A 1 mg/ORELHA) E DEXAMETASONA (DEXA, 0,05 mg/ORELHA). AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM (N= 5-8) DO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA EM MICRÔMETROS. ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE NEWMAN-KEULS. ### $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	91
FIGURA 25 -	EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MPO NO SOBRENADANTE DE HOMOGENATOS DE ORELHAS	

	SUBMETIDAS AO TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS COM TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO, QUE RECEBEU A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO), E DO GRUPO NAIVE. AS DOSES ESTÃO EM mg/ORELHA. A ATIVIDADE DA MPO FOI AVALIADA 24 H APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO TPA. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA FOI QUANTIFICADA POR MEIO DE LEITOR DE PLACA ($\lambda=620$ nm). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM. (N= 5-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE NEWMAN-KEULS. ### P< 0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	92
FIGURA 26 -	EFEITO DO α -PINENO E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MPO NO SOBRENADANTE DE HOMOGENATOS DE ORELHAS SUBMETIDAS AO TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS COM TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO), E DO GRUPO NAIVE. AS DOSES ESTÃO EM mg/ORELHA. A ATIVIDADE DA MPO FOI AVALIADA 24 H APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO TPA. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA FOI QUANTIFICADA POR MEIO DE LEITOR DE PLACA ($\lambda=620$ nm). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM (N= 5-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE NEWMAN-KEULS. ### P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. ** P<0,01 E *** P<0,001 QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.....	93
FIGURA 27 -	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> E DO α -PINENO SOBRE O EDEMA NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA. FOTOS REPRESENTATIVAS DE CORTES TRANSVERSAIS DE ORELHAS DE CAMUNDONGOS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA (AUMENTO DE 200X, ESCALA DE 200 μ m) COLETADAS APÓS A APLICAÇÃO DO TPA. (A) NAIVE, (B) VEÍCULO, (C) CONTROLE (TPA), (D) ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> (0,1 mg/ORELHA), (E) α -PINENO (1,0 mg/orelha) E (F) DEXAMETASONA (0,05 mg/ORELHA).....	94
FIGURA 28 -	PORCENTAGEM DE PRODUÇÃO DE NO, INDUZIDA POR LPS, DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> . OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE NEWMAN-KEULS. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	100
FIGURA 29 -	EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS. A EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO TERPENOS OCORREU DURANTE 24 H E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA	

	PELO ENSAIO DO MTT. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY.....	101
FIGURA 30 -	PORCENTAGEM DE PRODUÇÃO DE NO, INDUZIDA POR LPS, DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM α -PINENO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N =4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY.....	102
FIGURA 31 -	EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS. A EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO TERPENOS OCORREU DURANTE 24 H E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DO MTT. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY.....	102
FIGURA 32 -	EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	107
FIGURA 33 -	EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	108
FIGURA 34 -	EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI	

AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

109

FIGURA 35 -

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

112

FIGURA 36 -

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

113

FIGURA 37 -

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI

EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

114

FIGURA 38 -

EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O TERPENÓ E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) SÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

116

FIGURA 39 -

EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O TERPENÓ E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) SÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

117

FIGURA 40 -

EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O TERPENÓ E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) SÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....

118

- FIGURA 41 - EFEITO DO γ -TERPINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ E *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE..... 120
- FIGURA 42 - EFEITO DO γ -TERPINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE..... 121
- FIGURA 43 - EFEITO DO γ -TERPINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P<0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE..... 122
- FIGURA 44 - EFEITO DO TERPINEN-4-OL SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA

	DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L ⁻¹ FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. * P<0,05, ** P<0,01 E *** P<0,001 QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.....	124
FIGURA 45 -	EFEITO DO TERPINEN-4-OL SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM µg.mL ⁻¹ . COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L ⁻¹ FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	125
FIGURA 46 -	EFEITO DO TERPINEN-4-OL SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM µg.mL ⁻¹ . COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L ⁻¹ FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.....	126
FIGURA 47 -	EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS TERPENOS SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT. AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 (A), 48 (B) E 72 H (C) E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELA TÉCNICA DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM µg.mL ⁻¹ . COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-5).....	133
FIGURA 48 -	ATIVIDADE DA LDH CITOPLASMÁTICA LIBERADA NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM AS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 300 µg.mL ⁻¹ PELO PERÍODO DE 4 H. NO CONTROLE POSITIVO AS CÉLULAS FORAM TRATADAS COM TRITON X-100®. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N= 3-5). ANOVA,	

	SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. ### $P < 0.001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE POSITIVO (TRITON X-100®).....	136
FIGURA 49 -	CONTEÚDO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE.....	137
FIGURA 50 -	CONTEÚDO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADOS AO CONTROLE.....	138
FIGURA 51 -	CONTEÚDO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE <i>POST-HOC</i> DE TUKEY. ### $P < 0.001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE POSITIVO (VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1}) E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE.....	139
FIGURA 52 -	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS JURKAT DO GRUPO CONTROLE (A) E DOS GRUPOS TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE <i>E. benthamii</i> A $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) E $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). ESSA FIGURA É REPRESENTATIVA DE COMO FORAM OBTIDOS E ANALISADOS OS RESULTADOS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR.....	141
FIGURA 53 -	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS JURKAT DO GRUPO CONTROLE (A) E DOS GRUPOS TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> A $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) E $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). ESSA FIGURA É REPRESENTATIVA DE COMO FORAM OBTIDOS E ANALISADOS OS RESULTADOS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR.....	142
FIGURA 54 -	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS JURKAT DO GRUPO CONTROLE (A) E DOS GRUPOS TRATADOS COM O TERPINEN-4-OL A $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) E $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). ESSA FIGURA É REPRESENTATIVA DE COMO FORAM OBTIDOS E ANALISADOS OS RESULTADOS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR.....	143

FIGURA 55 - FRAGMENTAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE *E. benthamii* E TERPINEN-4-OL NAS CONCENTRAÇÕES DE 50, 100 E 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ PELO PERÍODO DE 24 HORAS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM, N= 4. ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE.....

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> , REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	65
TABELA 02 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO	71
TABELA 03 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	74
TABELA 04 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	77
TABELA 05 -	CONSTITUINTES QUÍMICOS ANALISADOS POR PCA E HCA NAS AMOSTRAS OEFJ VERÃO, OEFA VERÃO, OEFA OUTONO, OEFA INVERNO E OEFA PRIMAVERA.....	81
TABELA 06 -	IC ₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> E DOS COMPOSTOS α -PINENO, γ -TERPINENO E TERPINEN-4-OL PARA CÉLULAS TUMORAIS, DETERMINADOS PELA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CULTIVOS DE 24 H POR MEIO DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT.....	128
TABELA 07 -	IC ₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> E DOS COMPOSTOS α -PINENO, γ -TERPINENO E TERPINEN-4-OL PARA CÉLULAS TUMORAIS, DETERMINADOS PELA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CULTIVOS DE 72 H POR MEIO DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT.....	128
TABELA 08 -	PORCENTAGEM DE CÉLULAS JURKAT NÃO-VIÁVEIS EVIDENCIADAS PELA TÉCNICA DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN NOS TRATAMENTOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PELOS PERÍODOS DE 24, 48 E 72 H.....	134
TABELA 09 -	PORCENTAGEM DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. benthamii</i> E TERPINEN-4-OL NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR, G0/G1, S E G2/M.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALFAC	solução contendo 85 mL de etanol 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massas
DP	desvio padrão
DMAPP	pirofosfato de dimetilalila
DMSO	dimetilsulfóxido
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPM	erro padrão da média
<i>et al.</i>	expressão latina abreviada <i>et alli</i> , (=e outros)
EM	espectro de massas
FDP	difosfato de farnesila
FID	detector de ionização por chama (<i>flame ionization detector</i>)
h	horas
HCA	análise hierárquica de agrupamentos
HTAB	hexadeciltrimetilamônio
ICFR	<i>Institute for Commercial Forestry Research</i>
IPP	pirofosfato de isopentenila
IC ₅₀	concentração da amostra que inibiu 50% do crescimento celular
IR	índice de retenção
ISO	<i>International Standard Organization</i>
JUSS.	Jussieu
L'Hér.	L'Héritier
LDH	lactato desidrogenase
LDL	lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LPS	lipopolissacarídeo
MEP	metil eritritol
min	minuto
mL	mililitro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MVA	mevalonato
NO	óxido nítrico
O	oeste
OEFA	óleo essencial de folhas adultas de <i>E. benthamii</i>
OEJ	óleo essencial de folhas jovens de <i>E. benthamii</i>
PBS	phosphate buffered solution (solução-tampão fosfato)
PCA	análise de componentes principais
PIB	difosfato ou pirofosfato de geranila
RPMI	meio de cultivo
rpm	rotações por minuto
S	sul
SFB	soro fetal bovino
TMB	tetrametilbenzidina
TPA	acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TR	tempo de retenção

UPCB	Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná
°C	graus Celsius
mg	miligrama
µg	micrograma
µL	microlitro
m/z	razão massa/carga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS	28
3.1.1 Terpenos	33
3.2 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.	37
3.3 GÊNERO <i>Eucalyptus</i> L'Hér.	39
3.4 <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CAMBAGE	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLVENTES	50
4.1.1 Fármacos	50
4.1.2 Terpenos	50
4.1.3 Materiais usados no cultivo celular	50
4.1.4 Corantes	51
4.1.5 Outros reagentes e solventes	51
4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	52
4.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i>	52
4.3.1 Extração do óleo essencial das folhas de <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden et Cambage	52
4.3.2 Identificação dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas de <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden et Cambage por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa	53
4.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	53
4.4.1 Animais	53
4.4.2 Avaliação do edema de orelha	54
4.4.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA	54
4.4.3 Atividade da enzima mieloperoxidase	55
4.4.4 Análise histológica	55
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> E DO α -PINENO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA <i>EX VIVO</i> DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO	56
4.5.1 Obtenção dos macrófagos peritoniais de camundongo	56
4.5.2 Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial das folhas adultas de <i>E. benthamii</i> e do α -pineno em macrófagos de camundongo	56
4.5.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	57
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>E. benthamii</i> E DOS TERPENOS α -PINENO, γ -TERPINENO e TERPINEN-4-OL SOBRE CÉLULAS TUMORAIS	58
4.6.1 Cultura de células Jurkat – Modelo de linfócitos T de origem leucêmica	58
4.6.1.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT	59
4.6.1.2 Ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul de Tripan	59
4.6.1.3 Ensaio de viabilidade celular avaliado pela liberação de lactato desidrogenase (LDH)	60
4.6.1.4 Análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo	60
4.6.1.5 Análise do conteúdo de DNA celular	61

4.6.1.6 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo.....	62
4.6.2 Cultura das demais células de origem tumoral.....	62
4.6.2.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.....	62
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i>	64
5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	89
5.2.1 Efeito do óleo essencial de <i>E. benthamii</i> e do α -pineno sobre o edema de orelha e migração celular induzidos por TPA.....	89
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS ADULTAS DE <i>E. benthamii</i> E DO α -PINENO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA <i>EX VIVO</i> DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO.....	99
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>E. benthamii</i> E DOS TERPENOS α -PINENO, γ -TERPINENO e TERPINEN-4-OL SOBRE CÉLULAS TUMORAIS.....	105
6 CONCLUSÕES	148
REFERÊNCIAS.....	150
ANEXO.....	172

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática disseminada, normalmente baseada em crenças populares. Diferentes povos e formações culturais têm as adotado como alternativa terapêutica. Apesar de um relativo empirismo, essas plantas continuam sendo empregadas pela população, sendo que ainda não foram inteiramente substituídas pelos fármacos sintéticos. Essa notoriedade e importância incentivaram a investigação, por meio de comprovações científicas, a respeito da segurança e da eficácia terapêutica desses vegetais (NIERO *et al.*, 2003).

É necessário mencionar que além da contribuição na medicina popular, alguns fármacos tiveram sua origem a partir do estudo de alguns *taxa* vegetais (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Nesse sentido, as investigações sobre as plantas medicinais devem abarcar não só aspectos fitoquímicos, mas é necessário que se façam também abordagens a respeito de aspectos agroecológicos, microbiológicos, farmacológicos e biotecnológicos, visando ampliar as possibilidades na procura de novos agentes terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006; DIXON, 2001; PHILLIPSON, 2001).

Por mais de 60 mil anos, aborígenes australianos têm desenvolvido uma avançada compreensão sobre algumas plantas, como *Eucalyptus* spp. No Brasil, o cultivo de espécies desse gênero iniciou em meados do século passado. Na década de 1990, a maior área de cultivo de *Eucalyptus* do mundo foi registrada em território brasileiro (ELDRIGDE, 1994). Atualmente, o eucalipto é a espécie florestal mais plantada no território nacional, ocupando uma área superior a 4,75 milhões de hectares (ANUÁRIO, 2011). Essas árvores têm grande relevância na economia brasileira, sendo extensivamente empregadas como matéria-prima na construção civil e em indústrias de compensado e de papel (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). Além da exploração da madeira, o óleo essencial obtido a partir das folhas de *Eucalyptus* é amplamente aproveitado na fabricação de produtos farmacêuticos e de limpeza e nas indústrias de perfumaria. Por esse motivo, os óleos essenciais desse gênero passaram a ter um interesse econômico crescente, uma vez que as folhas do eucalipto podem ser consideradas um bioproduto do corte das árvores (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

Em razão de alguns representantes de *Eucalyptus* terem sua utilização relacionada especificamente à produção de madeira e à obtenção de celulose, estudos fitoquímicos e medicinais são mais restritos para essas espécies. Dessa forma, investigações complementares podem ampliar o uso desses taxa, inclusive como uma fonte paralela de recursos econômicos.

Eucalyptus benthamii Maiden et Cabbage é uma das espécies mais empregadas em regiões de reflorestamento no sul do Brasil. Essas áreas estão sujeitas a invernos rigorosos e a geadas frequentes que prejudicam o crescimento ou a sobrevivência de algumas árvores. Por isso, *E. benthamii* vem ganhando notoriedade. Essa espécie apresenta alta capacidade de rebrota e elevada resistência ao frio, suportando temperaturas de até -6°C (LIMA, 2009; HIGA, 1999). Em estudos realizados com diversos representantes de *Eucalyptus*, *E. benthamii* tem sido a espécie de crescimento mais acelerado do gênero (HIGA; CARVALHO, 1990). Diferentes avaliações tecnológicas da sua madeira (densidade, poder calorífico, teor de lignina) têm mostrado adequação para fins energéticos. Em razão disso, nos últimos anos, foi possível notar uma expansão gradual da área plantada, estimando-se que, atualmente, existam dez mil hectares ocupados por essa espécie (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2011).

No entanto, investigações envolvendo aspectos fitoquímicos e farmacológicos de *E. benthamii* são escassas. Na literatura, Silva, Brito e Silva Júnior (2006), verificaram a presença do hidrocarboneto terpênico α -pineno, como constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*. Boscardin (2009) demonstrou que o óleo essencial de *E. benthamii* apresenta atividade biológica contra *Pediculus humanus capitis* e atividade antimicrobiana. Lucia e colaboradores (2011) relataram atividade larvicida/adulticida contra exemplares do mosquito *Aedes aegypti* a partir do óleo essencial da espécie *E. benthamii* var *benthamii*. Esses resultados, embora promissores, não esgotam as possibilidades de aplicação medicinal do óleo volátil das folhas dessa espécie, considerando a elevada área em cultivo e a necessidade do aproveitamento das folhas como bioproduto do corte das árvores. Dessa forma, estudos farmacológicos adicionais se fazem necessários no sentido de estabelecer outras possibilidades de uso terapêutico do óleo essencial de *E. benthamii*, o que configura a importância e a originalidade da presente tese.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o potencial anti-inflamatório e o efeito citotóxico do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage e de terpenos relacionados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar a coleta das folhas de *E. benthamii* em diferentes estações do ano;
- Realizar a extração do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*;
- Identificar os compostos voláteis presentes na essência das folhas de *E. benthamii*;
- Comparar a constituição dos óleos essenciais extraídos a partir de folhas coletadas durante o verão, o outono, o inverno e a primavera;
- Analisar o efeito anti-inflamatório do óleo volátil das folhas adultas de *E. benthamii* e do terpeno α -pineno por meio do modelo de edema de orelha;
- Verificar a ação do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e do α -pineno sobre a migração celular por meio de análises histológicas e da atividade da enzima mieloperoxidase;
- Verificar o efeito do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e do α -pineno sobre a produção de óxido nítrico em cultura *ex vivo* de macrófagos de camundongo;
- Investigar a ação do óleo essencial das folhas adultas e jovens de *E. benthamii* e dos terpenos α -pineno, γ -terpineno e terpinen-4-ol sobre as linhagens tumorais Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A.1;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas aromáticas têm sido utilizadas desde a antiguidade, devido às suas propriedades conservantes, às suas atividades medicinais e para conferir aroma e sabor aos alimentos. Em geral, propriedades terapêuticas de plantas aromáticas são atribuídas aos óleos essenciais. O termo “óleo essencial” foi usado pela primeira vez durante a Renascença, no século 16, por Paracelsus von Hohenheim, e designava “a alma da planta” ou a “quinta essência” para a cura (GUENTHER, 1950).

Na atualidade, o Brasil ocupa um lugar de destaque na produção de essências, ao lado da Índia, da China e da Indonésia, sendo considerados os quatro grandes produtores. No entanto, apesar da posição de destaque do Brasil no cenário mundial, há falta de manutenção do padrão de qualidade das essências produzidas e baixos investimentos governamentais no setor, que levam a um quadro de estagnação (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais ou seus componentes são amplamente utilizados em perfumes e produtos cosméticos, em medicamentos, em produtos sanitários, em odontologia, na agricultura, como alimentos conservantes e como aditivos para alimentos. Além disso, também são empregados em terapias alternativas, como a aromaterapia, a qual faz uso das essências para curar, abrandar ou prevenir doenças por meio de inalação (BUCHBAUER *et al.*, 1993).

Os óleos essenciais são também denominados de óleos voláteis, de óleos etéreos ou de essências, em função de suas propriedades físicas. Podem ser definidos, de maneira geral, como misturas complexas de substâncias aromáticas, lipofílicas, voláteis e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2007). Ou ainda, como líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, e resultantes do metabolismo secundário das plantas (PINHEIRO, 2003).

Os óleos essenciais apresentam características físicas comuns, embora tenham composições químicas distintas. São líquidos voláteis e límpidos, possuem sabor geralmente acre e picante e coloração incolor ou discretamente amarelada. A

volatilidade dos óleos essenciais é uma das principais características que os diferencia dos óleos fixos. São lipossolúveis, parcialmente solúveis em água ou insolúveis, sendo, no entanto, solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter (SIMÕES; SPITZER, 2007; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; TYLER; BRADY; ROBBERS, 1988). A maior parte dos óleos essenciais possui índice de refração e são opticamente ativos, sendo que essas propriedades podem ser utilizadas na identificação e no controle da qualidade desses compostos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetativos das plantas, ou seja, raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes, sendo armazenados em estruturas anatômicas especializadas (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007). Dependendo da família à qual pertencem, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como células parenquimáticas diferenciadas (idioblastos), tricomas glandulares e tricomas tectores, canais oleíferos e ductos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (SIMÕES; SPITZER, 2007). Os óleos essenciais provenientes de diferentes partes da mesma planta podem ter aroma e propriedades completamente diferentes.

Outro aspecto importante, diretamente relacionado ao uso dos óleos essenciais, refere-se a sua forma de obtenção. Eles podem ser extraídos por meio de diversos processos, de acordo com a localização do óleo volátil no vegetal, da quantidade e do propósito de uso do mesmo. Os métodos mais frequentes para sua extração são: enfloração ou *enfleurage*, prensagem ou expressão, extração com solventes orgânicos, extração por fluido supercrítico e destilação por arraste de vapor (SIMÕES; SPITZER, 2007; HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Na natureza, uma das principais funções biológicas exercida pelos óleos voláteis está relacionada à atração de polinizadores. No entanto, além dessa, existem outras funções ecológicas, como a inibição da germinação, a proteção contra predadores e a proteção contra a perda de água e o aumento de temperatura (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais e seus compostos individuais apresentam inúmeras atividades farmacológicas e terapêuticas sendo, portanto, agentes de grande potencialidade no tratamento de vários estados patológicos.

Radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio causam oxidação de biomoléculas e produzem diversas alterações moleculares relacionadas a várias

doenças (ZARKOVIC, 2003; BUTTERFIELD; LAUDERBACK, 2002). Nesse sentido, os óleos essenciais, como fontes naturais de componentes fenólicos, têm atraído o interesse de investigadores, a fim de avaliar seu potencial como agentes antioxidantes ou sequestradores de radicais livres. E, por meio de vários estudos, esse efeito tem sido comprovado (MIGUEL, 2010; TOMAINO *et al.*, 2005; SOKMEN *et al.*, 2004; TEPE *et al.*, 2004).

Da mesma forma, é bem conhecido o potencial citotóxico de óleos essenciais. Esta propriedade citotóxica é de grande importância na indicação de uso dos óleos voláteis contra uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, (CERMELLI *et al.*, 2008; BASILE *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2005), vírus (DUSCHATZK *et al.*, 2005), fungos (CAVALEIRO *et al.*, 2006; PAWAR; THAKER, 2006; SALGADO *et al.* 2003), insetos (BOSCARDIN, 2009; TOLOZA *et al.*, 2008; BURFIELD; REEKIE, 2005; KOUNINKI *et al.*, 2005), protozoários (MONZOTE *et al.*, 2006; MOON *et al.*, 2006) e moluscos (LAHLOU; BERRADA, 2001). Por serem típicas moléculas lipofílicas, os óleos essenciais são capazes de passar pela membrana plasmática, e consequentemente, afetar a estrutura de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, tornando-a permeável. Portanto, a citotoxicidade de óleos voláteis pode estar relacionada aos danos ocasionados na membrana celular.

Os óleos essenciais também são usados para o tratamento de doenças não-infecciosas. Diversos estudos têm demonstrado o potencial desses metabólitos secundários no combate a doenças cardiovasculares. Óleos essenciais e seus constituintes aromáticos podem inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo os riscos de aterosclerose, visto que o aumento nos níveis de LDL oxidada desempenha um papel importante na iniciação desse processo (GRASSMANN *et al.*, 2003, 2005; NADERI *et al.*, 2004; TEISSEDRE; WATERHOUSE, 2000). Outras investigações têm apontado que os óleos voláteis podem diminuir os níveis plasmáticos de colesterol total e de triglicerídeos, reduzindo assim a formação das placas ateroscleróticas (ALI; BLUNDEN, 2003; YAZDANPARAST; ALAVI, 2001; YASNI *et al.*, 1994). Além disso, os óleos essenciais podem exercer uma atividade hipotensora. Alguns óleos voláteis têm demonstrado uma diminuição da pressão arterial sistólica em ratos, por via oral (TALPUR *et al.*, 2005), enquanto que a administração intravenosa tem conduzido a uma hipotensão significativa e dose-dependente, associada à diminuição da frequência cardíaca (GUEDES *et al.*, 2004).

A presença de dados etnofarmacológicos e essas diversas propriedades terapêuticas têm atraído a atenção de pesquisadores no sentido de também avaliar o potencial anticâncer de óleos essenciais, tendo em vista o fato de que seu mecanismo de ação, em geral, é diferente da atividade clássica dos agentes quimioterápicos citotóxicos (RAJESH; STENZEL; HOWARD, 2003). Estudos preliminares indicam que os componentes voláteis de um óleo essencial, principalmente os monoterpenos, têm múltiplos efeitos farmacológicos sobre a via celular do mevalonato, o que pode contribuir para uma atividade supressiva tumoral terpeno-dependente (ELSON, 1995). Outros estudos sugerem que os óleos essenciais ou seus compostos individuais podem ser utilizados para proteger diferentes órgãos contra a carcinogênese atuando, dessa forma, como agentes quimiopreventivos (PARIJA; DAS, 2003; GUYTON; KENSLER, 2002; PUATANACHOKCHAI *et al.*, 2002; MILNER, 2001; STRATTON *et al.*, 2000; JIRI; PARIJA; DAS, 1999; HENDERSON *et al.*, 1998; MULDER *et al.*, 1995). Além disso, quando testados em linhagens de células humanas de câncer, diversas investigações demonstraram que óleos voláteis apresentam uma atividade supressiva contra o câncer, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (DE SOUSA *et al.*, 2004; CALCABRINI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2001; BUHAGIAR *et al.*, 1999). Esses dados indicam a importância de ampliar ainda mais os ensaios clínicos antitumorais com óleos essenciais, bem como de investigar a atividade anticâncer de seus constituintes terpênicos majoritários.

Considerando que os óleos essenciais são capazes de sequestrar radicais livres, eles podem também agir como agentes anti-inflamatórios, uma vez que a resposta inflamatória normalmente envolve o estresse oxidativo, que ocorre em diferentes células. Além disso, os óleos essenciais têm sido usados clinicamente contra vários tipos de doenças inflamatórias, como alergias, reumatismo e artrite (SERAFINO *et al.*, 2008). Nesse sentido, diversos estudos têm relatado os benefícios anti-inflamatórios dos óleos essenciais (SÜNTAR *et al.*, 2012; OCAÑA-FUENTES *et al.*, 2010; MIGUEL *et al.*, 2010; HAJHASHEMI; SAJJADI; HESHMATI, 2009; JUHÁS *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2007; ESTEVES *et al.*, 2005; CHAO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2003).

Outros trabalhos têm demonstrado os efeitos potenciais dos óleos essenciais como agentes antidiabéticos (TALPUR *et al.*, 2005, ABDOLLAHI *et al.*, 2003), antiplaquetários (BALLABENIA *et al.*, 2004), tranquilizantes (HOSSAIN *et al.*, 2004;

KOO *et al.*, 2003) e potencializadores de penetração de fármacos por via transdérmica (BIRUSS; KAHLIG; VALENTA, 2007; FANG *et al.*, 2004).

Em relação à composição química, os óleos essenciais são constituídos por moléculas de baixa massa molecular, denominadas genericamente de fenilpropanoides e de terpenos. A maioria dos constituintes voláteis pertence ao grupo dos terpenos, sendo que os componentes terpênicos mais frequentemente encontrados nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Outros terpenos, como os diterpenos, são verificados apenas em óleos extraídos com solventes orgânicos. Além disso, a composição química e as concentrações dos constituintes voláteis podem sofrer a influência de diversos fatores, como método de extração, processo de secagem do material botânico e condições edafo-climáticas (SIMÕES; SPITZER, 2007; COSTA *et al.*, 2005; VITTI; BRITO, 1999).

A análise da composição química de óleos essenciais é geralmente efetuada por meio da cromatografia gasosa (CG) e da cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massas (CG-EM). A CG é um método usualmente empregado para a separação e para a análise de misturas de substâncias voláteis. Nessa técnica, a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de gás, denominado de gás de arraste ou de fase móvel. O fluxo de gás, juntamente com a amostra, passa pela coluna cromatográfica contendo a fase estacionária, na qual ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas saem da coluna, dissolvidas no gás de arraste, e passam por um detector, dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro desse sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que os compostos são representados por picos, com área proporcional à sua concentração, o que possibilita a análise quantitativa. Cada componente produz um pico espectral específico. O tempo decorrido entre a injeção da amostra e a saída da coluna cromatográfica é chamado de tempo de retenção. Em um sistema CG-EM, as amostras provenientes do cromatógrafo a gás são bombardeadas por elétrons e geram íons positivos, negativos e radicais. Os íons são, então, separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e detectados. Dessa forma, o cromatógrafo gasoso separa a mistura de compostos em picos de substâncias químicas puras e o espectrômetro de massa identifica e quantifica os componentes químicos (HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011; EWING, 2002).

3.1.1 Terpenos

Os terpenos representam a maior classe de metabólitos secundários provenientes de plantas. Mais de 8.000 estruturas terpênicas têm sido relatadas (BREITMAIER¹, 1999 *apud* SIMÕES; SPITZER, 2007). A estrutura química dos terpenos é extremamente variável, exibindo centenas de estruturas químicas diferenciadas.

Esses compostos orgânicos são também conhecidos como isoprenoides ou terpenoides, após a oxidação ou o rearranjo molecular. O termo terpenoide deriva da denominação dada aos primeiros compostos isolados da turpentina, como “terpentin”, em alemão.

Apesar da ampla variabilidade em termos estruturais, todos os terpenos são derivados da condensação de unidades de isopreno (C₅), embora ele não seja o precursor biológico, mas sim, o pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero alílico, o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (CROTEAU, 2000).

Até recentemente, acreditava-se que IPP e DMAPP fossem exclusivamente sintetizados a partir da via citoplasmática do mevalonato. O fluxo por essa via é regulado pela atividade da β -3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMGC_oA redutase) em mamíferos e fungos (CHAPPELL *et al.*, 1995). Estudos que investigaram o papel regulador da HMGC_oA redutase em plantas produziram resultados controversos. A superexpressão de HMGC_oA redutase de hamster em plantas de tabaco, por exemplo, favoreceu o acúmulo de esteroides totais, enquanto os níveis de isoprenoides, tais como os carotenoides, ou a cadeia fitol da clorofila, mantiveram-se relativamente inalterados nessas plantas transgênicas (CHAPPELL *et al.*, 1995). Essa controvérsia foi mais tarde racionalizada, pela descoberta de um caminho independente da via do mevalonato para a síntese de IPP em plantas (RODRIGUEZ-CONCEPCION; BORONAT, 2002).

Dessa forma, a biossíntese dos terpenos ocorre por duas vias distintas: a via do mevalonato (MVA) no citoplasma celular e a via do metil eritritol (MEP) nos plastídios das células (DEWICK, 2001). Ambas as vias levam à formação do IPP e

¹ BREITMAIER, E. **Terpene**. Stuttgart: Teubner, 1999, 227 p.

seu isômero alílico DMAPP, que são os “blocos de construção” para a biossíntese dos terpenoides. Em ambos os compartimentos, IPP e DMAPP são usados por prenil transferases em reações de condensação tipo Claisen e aldólica para produzir difosfatos de prenila maiores, como o precursor dos monoterpenos, o difosfato ou pirofosfato de geranila (PIB), e o precursor dos sesquiterpenos, o difosfato de farnesila (FDP). Embora existam evidências crescentes de que há troca de intermediários entre esses compartimentos, a via do mevalonato é geralmente considerada para fornecer os precursores para a produção de sesquiterpenos e triterpenos (incluindo esteroides). Enquanto que a via do MEP fornece os precursores para a produção de hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (EISENREICH *et al.*, 2004).

Dependendo do número de unidades de isopreno condensadas, os terpenos são classificados por tamanho em monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os terpenos são comercialmente interessantes, devido à utilização como flavorizantes em alimentos e como perfumes em cosméticos, ou porque são importantes para a qualidade de produtos agrícolas, como no sabor de frutas e na fragrância de flores. Além disso, essa classe de metabólitos apresenta diversas propriedades medicinais. Na Figura 01 estão apresentados alguns exemplos de terpenos de interesse farmacológico.

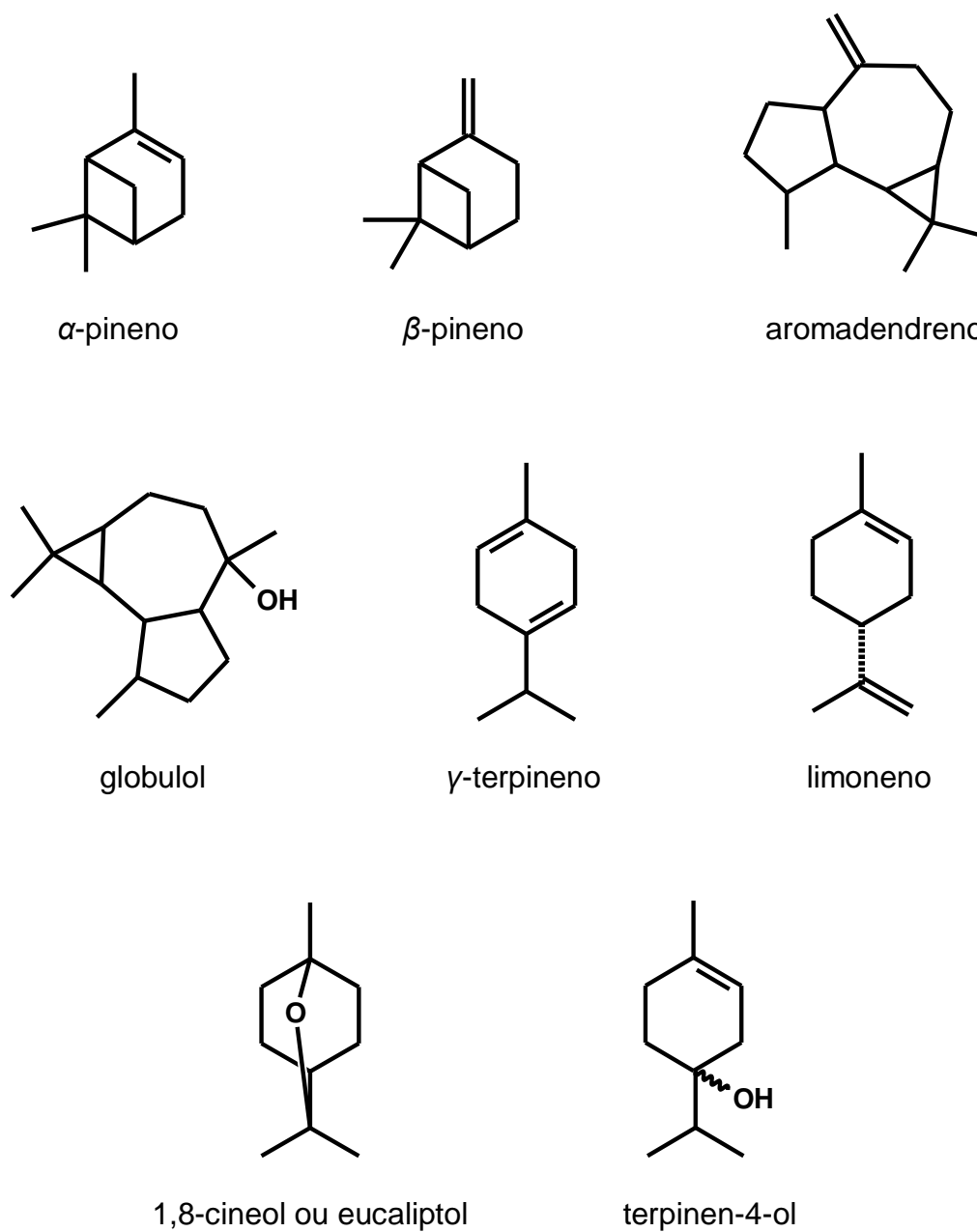


FIGURA 01 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS TERPENOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO

Algumas investigações relataram o efeito de alguns terpenos em doenças degenerativas, como diversos tipos de câncer (CAVALIERI *et al.*, 2004; CARNESECCHI *et al.*, 2004; GUANG *et al.*, 2004). Monoterpenos têm demonstrado exercer atividades quimiopreventivas e quimioterápicas em alguns modelos de tumor. A quimioprevenção ocorre durante a fase de iniciação da carcinogênese, para evitar a interação de carcinógenos químicos com o DNA (WATTENBERG, 1992). A quimioterapia ocorre durante a fase de promoção, na qual a inibição da proliferação de células tumorais, a aceleração da taxa de morte das células tumorais e/ou a indução da diferenciação celular tumoral podem ocorrer (MORSE; STONER, 1993). Um dos fatores favoráveis à aplicação dos monoterpenos no tratamento a doenças degenerativas é o fato de muitos deles possuírem alta biodisponibilidade quando administrados oralmente (PHILLIPS; MALSPEIS; SUPKO, 1995).

Outros estudos indicaram que os principais componentes químicos de óleos voláteis podem ser responsáveis por efeitos cardiovasculares (INTERAMINENSE *et al.*, 2005). Inclusive, os terpenos podem contribuir na resolução de doenças cardiovasculares, inibindo a oxidação do LDL colesterol e exercendo propriedades hipotensoras (GRASSMANN *et al.*, 2003, 2005; LAHLOU *et al.*, 2003). Em investigação com o monoterpeno oxigenado 1,8-cineol, foi evidenciado hipotensão em ratos após o tratamento intravenoso, sendo que esse efeito foi relacionado a um mecanismo de relaxamento vascular ativo (LAHLOU *et al.*, 2002). Menezes e colaboradores (2010) relataram ainda o potencial hipotensor dos monoterpenos α -pineno, β -pineno, citronelal e linalol e do sesquiterpeno α -bisabolol em ratos normotensos não anestesiados.

Os terpenos também têm sido pesquisados quanto ao seu potencial anti-inflamatório. Em ensaio de edema de pata de rato induzido pela carragenina, foi demonstrado atividade antiedematogênica dos terpenos α -pineno e β -pineno. Com a administração de uma mistura desses dois terpenos com timol e carvacrol, foi verificado um aumento potencial dessa atividade, sugerindo um sinergismo entre os compostos (LORENTE *et al.*, 1989). Segundo Pongprayoon e colaboradores (1997), os monoterpenos terpinen-4-ol e α -terpineno inibem significativamente a formação de edema em pata de rato induzido pelo agente flogístico carragenina. Em estudo realizado com mono e sesquiterpenos, utilizando o método da pleurisia induzida por lipopolissacarídeo em camundongos, foi observada uma atividade anti-inflamatória

positiva para δ -3-careno, 1,8-cineol, linalol, aromadendreno e β -cariofileno (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Os monoterpenos podem causar uma intervenção tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas de insetos herbívoros (BRATTSTEN, 1998). Prates *et al.* (1998a) verificaram que o monoterpeno 1,8-cineol é um dos componentes do óleo essencial do capim-gordura (10,6%), sendo capaz de matar 100% das larvas do carrapato *Boophilus microplus* em cinco minutos. Esse efeito inseticida dado ao 1,8-cineol tem sido corroborado por outros diversos estudos (PRATES *et al.*, 1998b).

Além desses usos, os terpenos exibem ainda propriedades antimaláricas, antiúlcera, analgésicas, antimutagênicas e diuréticas (BERTEA *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-CONCEPCION, 2004; HAUDENSCHILD; CROTEAU, 1998; MCCASKILL; CROTEAU, 1998). Também são considerados excelentes promotores da permeação de fármacos para a liberação transdérmica (AQIL *et al.*, 2007).

3.2 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.

A família Myrtaceae é composta por, aproximadamente, 144 gêneros e 3100 a 4600 espécies (SOBRAL, 2003). Essa família pertence à ordem Myrtales ou Myrtiflorae, e compreende duas grandes subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae. A subfamília Leptospermoideae possui maior concentração na Austrália e é representada por suas folhas alternas e seus frutos secos. Myrtoideae distribui-se principalmente na América do Sul e na América Central e apresenta uma única tribo, Myrteae, dividida em três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae. Essa subfamília apresenta folhas opostas e frutos carnosos (LEGRAND; KLEIN, 1978). Uma nova classificação infra-família proposta por Wilson *et al.* (2005) reconhece duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylloideae, e 17 tribos.

As espécies da família Myrtaceae são plantas arbustivas ou arbóreas. A família se distingue por uma combinação das seguintes características: folhas inteiras contendo glândulas de óleo, ovário semi-ínfero a ínfero, estames geralmente numerosos, floema interno, e pontuações guarnecidas nos vasos de xilema (WILSON *et al.*, 2001). E, de acordo com Joly (1998), os *taxa* pertencentes a essa família são plantas lenhosas, arbóreas ou arbustivas. As folhas são inteiras, de

disposição alterna ou oposta e, às vezes, oposta cruzada, apresentando pontuações e revelando estípulas muito pequenas. É frequente a presença de cauliflora. Em relação às flores, a ocorrência maior é as de coloração branca ou, às vezes, avermelhadas, sendo qualificadas como efêmeras, hermafroditas e com simetria radial. As flores, geralmente, são pentâmeras, mono ou diclamídeas, evidenciando muitas vezes um receptáculo bem desenvolvido. A corola pode ser suprimida e apresentar cálice gamossépalo com deiscência transversal. É comum a presença de numerosos estames. O ovário varia de súpero a semi-ífero, até ífero, podendo ser pentacarpelar e pentalocular, com muitos óvulos. O fruto é do tipo baciforme ou capsular loculicida. As sementes podem apresentar poliembrionia e, também, podem ser do tipo aladas.

A família Myrtaceae compreende 1,32% do total de angiospermas conhecidas, o que é bastante representativo, levando-se em consideração um total de 400 famílias (JUDD *et al.*, 1999). Os maiores gêneros dessa família são *Eugenia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Syzygium* e *Melaleuca* (CRONQUIST, 1981). No continente americano, plantas frutíferas como pintangueira e uvaia (*Eugenia* spp.); goiabeira e araçazeiro (*Psidium* spp.); jaboticabeira e cambuizeiro (*Myrciaria* spp.) são os maiores representantes desse grupo botânico (JOLY, 1998).

Na flora brasileira, os exemplares mais comuns são a goiabeira e o araçazeiro (*Psidium*), a jaboticabeira (*Myrciaria*), a pintangueira, a uvaia, a grumixameira e o cambucazeiro (*Eugenia*), o araçá-felpudo (*Campomanesia*) e o cambuci (*Paivaea*) (JOLY, 1966). E, dentre as cultivadas, merecem destaque especial as espécies originárias da Austrália, as quais geralmente apresentam folhas alternas e fruto seco do tipo capsular como, por exemplo, os representantes do gênero *Eucalyptus*.

No Brasil, as Myrtaceae constituem uma das mais importantes famílias de Angiospermae ou Magnoliopsida. Além disso, é reconhecido o valor dessa família, devido ao importante papel na fitossociologia das florestas do sul e sudeste do país, e por ser um dos grupos predominantes do componente arbóreo da Floresta Atlântica (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; CRUZ; KAPLAN, 2004).

Cruz e Kaplan (2004) realizaram um levantamento sobre o uso medicinal de espécies da família Myrtaceae no Brasil e verificaram que cerca de 70% dos representantes dessa família podem ser empregados para fins medicinais. A utilização medicinal desses *taxa* está relacionada principalmente a distúrbios

gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, as cascas e, também, os frutos, os quais são habitualmente consumidos.

Além disso, diversos estudos contemporâneos têm respaldado o uso popular de espécimes dos diversos gêneros de Myrtaceae, por meio de diferentes investigações farmacognósticas, relacionadas aos aspectos botânicos, aos compostos fitoquímicos e às atividades biológicas (DEFAVERI *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011; AYEPOLA; ADENIYI, 2008; CRUZ; KAPLAN, 2004).

3.3 GÊNERO *Eucalyptus* L'Hér.

A palavra *Eucalyptus* é derivada do grego *eu* (=bem) e *kalypto* (=cobrir) em menção ao opérculo que cobre as sementes até que estejam completamente desenvolvidas (GUENTHER, 1977).

O botânico francês Charles-Louis L'Heritier de Brutelle realizou a primeira descrição botânica do gênero *Eucalyptus* em 1788 (ANDRADE; VECCHI, 1918; SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). A espécie farmacopeica *Eucalyptus globulus* Labill. foi descoberta na Tasmânia, por La Billardiére, em 1792. Somente em 1800 é que um pequeno número de espécies começou a ser descrito, sendo que grande parte desses *taxa* foram nominados por Joseph Smith (BROOKER, 2002).

A introdução do *Eucalyptus* no Brasil é controversa. De acordo com Moura *et al.*² (1980 *apud* COUTINHO *et al.* 2004), o gênero *Eucalyptus* foi trazido para o Brasil em 1825 por D. Pedro I. As mudas seriam das espécies *Eucalyptus robusta* Sm. e *Eucalyptus tereticornis* Sm. e foram plantadas no Jardim Botânico na cidade do Rio de Janeiro. No entanto, para Andrade e Vecchi (1918), é difícil determinar com segurança a data de introdução desse gênero no Brasil. Segundo esses autores, os primeiros eucaliptos parecem ter sido plantados no Rio Grande do Sul, em 1868, por Frederico de Albuquerque. Nesse mesmo ano, alguns exemplares

² MOURA, V. P. G. *et al.* **Avaliação de espécies de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais.** Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1980, 104p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de Pesquisa 1).

foram plantados na Quinta da Boa Vista, no Rio de Janeiro, pelo tenente Pereira da Cunha.

Eucalyptus é um gênero pertencente à família Myrtaceae, que inclui cerca de 900 espécies e subespécies (BROOKER; KLEINIG, 2006). Essas árvores são nativas da Austrália, sendo que a maior parte de suas espécies ocorre naturalmente no continente australiano e também em ilhas adjacentes. Porém, é possível encontrar espécies endêmicas em Papua Nova Guiné e algumas espécies que somente são verificadas na parte oeste do arquipélago da Indonésia e, também, nas Filipinas. Atualmente, esse gênero está distribuído mundialmente. A introdução de exemplares desse grupo botânico em tantos países pelo mundo se deve ao fato de que seu cultivo é possível nas mais diferentes e severas condições de clima e de temperatura, ocorrendo tanto em áreas tropicais quanto em áreas de temperaturas mais frias. Os eucaliptos podem ocupar solos secos e úmidos, areias inférteis, vales e até mesmo lugares pantanosos. Algumas espécies, excepcionalmente, são tão resistentes, que suportam a exposição a fortes ventos, frio intenso e rigorosas nevascas (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962). Além disso, o cultivo dessas árvores permite retorno econômico dentro de um breve período de tempo (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005).

Uma grande variedade de tipos de madeira é produzida a partir dos eucaliptos. E, devido a essa diversidade de propriedades, é que os eucaliptos podem ser utilizados para as mais diferentes finalidades, como na produção de celulose e papel, mobiliário, postes, dormentes, mourões, energia e construção civil (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962). Entretanto, é importante ressaltar que os óleos voláteis, produzidos a partir da maioria das espécies de *Eucalyptus*, são subutilizados no aspecto econômico e comercial.

Por mais de 60 mil anos, aborígenes australianos desenvolveram uma sofisticada compreensão empírica de plantas, como as espécies de *Eucalyptus*. Não existem muitos dados relativos ao emprego do eucalipto pelos aborígenes australianos, porém é sabido que eles utilizavam não só as folhas, mas também a resina e a casca. Com a casca, preparavam decocções para disenteria e também, para lavar feridas. A casca também era empregada como antisséptico (ALONSO, 1998).

Desde então, esse gênero têm contribuído de maneira efetiva na medicina tradicional. Os principais usos populares dos eucaliptos estão relacionados ao

sistema respiratório. A inalação de substâncias provenientes de *Eucalyptus* tem sido usada no tratamento de faringite, bronquite e sinusite (CERMELLI *et al.*, 2008). Essas propriedades medicinais dos eucaliptos estão, normalmente, associadas aos seus componentes voláteis. O óleo essencial de eucalipto tem demonstrado atividades expectorante, fluidificante e antisséptica da secreção dos brônquios tanto pela via oral quanto inalatória (SIMÕES; SPITZER, 2007). A atividade antisséptica também pode ser evidenciada nos sistemas urogenitais e digestivo, sendo o eucaliptol o componente mais ativo (ALONSO, 1998).

A folha é a parte da planta geralmente investigada, mas também é possível isolar constituintes fitoquímicos do caule (BROPHY; SOUTHWELL, 2002). A maior parte do óleo essencial desse gênero está presente nas folhas, sendo que é proveniente de pequenas cavidades globulares ou glândulas. Essas cavidades globulares estão localizadas em todo o parênquima foliar da maioria das espécies do gênero e podem ser encontradas desde o início do desenvolvimento das folhas (VITTI; BRITO, 2003). Também é possível encontrar óleo essencial de eucalipto nos ramos terminais, na casca, nos botões florais e nos frutos. O óleo essencial obtido a partir das folhas é composto por uma complexa mistura de componentes orgânicos voláteis, muitas vezes envolvendo de 50 a 100 compostos, ou mais. Os compostos predominantes são os monoterpenos e sesquiterpenos (FABROWSKI, 2002; VITTI; BRITO, 2003).

Diversas investigações têm sido conduzidas com o óleo essencial de determinadas espécies de *Eucalyptus*, com a finalidade de determinar possíveis aplicações terapêuticas e/ou confirmar o uso já estabelecido pela medicina popular.

Em estudo realizado por Franco *et al.* (2005), foi verificado o potencial antimicrobiano do óleo essencial da espécie *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Cermelli *et al.* (2008) investigou a atividade antibacteriana e antiviral do óleo essencial de *E. globulus* frente a patógenos isolados de pacientes com infecção no trato respiratório. As bactérias *Haemophilus influenzae*, *Parainfluenzae* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram as mais sensíveis à ação do óleo essencial, seguidas do *Streptococcus pneumoniae*. O fungo *Candida albicans* também apresenta sensibilidade ao óleo essencial de *E. globulus* (ALONSO, 1998).

Considerando o fato de que óleos essenciais apresentam atividades inseticidas (ISMAN, 1999), alguns estudos têm sido conduzidos com o óleo volátil de

espécies do gênero *Eucalyptus*, a fim de avaliar a atividade biológica contra *Pediculus humanus capitis*. Em estudo conduzido por Toloza *et al.* (2008) e realizado com as espécies *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *E. tereticornis*, e os híbridos *E. grandis* x *E. camaldulensis* e *E. grandis* x *E. tereticornis*, foi evidenciado que o óleo essencial extraído desses eucaliptos apresenta potencial pediculicida e repelente, sendo que a hibridação interespecies melhora essa atividade. De acordo com Daley (2007), vários constituintes do óleo essencial de *E. globulus* têm efeitos letais contra espécimes de *Pediculus humanus capitis* e seus ovos. O 1,8-cineol é considerado duas vezes mais eficaz que a *D*-fenotrina e o piretro, enquanto o (-)- α -pineno, o 2- β -pineno e o (*E*)-pinocarveol são tão ativos quanto esses compostos sintéticos. Audino *et al.* (2007) constatou que a combinação a 10% do óleo essencial de *E. globulus* e do óleo essencial de *Mentha x piperita* L., em solução de etanol a 96%, foi tão efetivo contra os piolhos resistentes à permetrina, quanto a melhor preparação comercial disponível na Argentina. Boscardin (2009) verificou que o óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage apresenta atividade fumegante e ação repelente contra o *Pediculus humanus capitis*.

Alguns estudos também têm investigado o potencial dos óleos essenciais de *Eucalyptus* como agentes analgésicos e anti-inflamatórios. Foi demonstrado que os óleos essenciais de *E. tereticornis* e de *E. globulus* induziram efeitos analgésicos e promoveram efeitos anti-inflamatórios em modelos de edema de pata de rato (SILVA *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores têm relatado que monoterpenos de óleos de *Eucalyptus* são potentes inibidores de mediadores inflamatórios. O eucaliptol inibe a produção do fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β , leucotrieno B₄ e tromboxano B₂ (JUERGENS *et al.*, 1998a). Além disso, há dados indicando que o eucaliptol promove a inibição do metabolismo do ácido araquidônico em monócitos humanos (JUERGENS *et al.*, 1998b).

Os óleos essenciais obtidos dos eucaliptos são destinados, principalmente, para fins medicinais, porém, existem outras utilizações habituais: na forma de vaporização em saunas ou banhos, na perfumaria, na indústria de alimentos e em produtos desinfetantes (FABROWSKI, 2002). Dentre as espécies de *Eucalyptus* conhecidas, cerca de 400 taxa fornecem óleos essenciais com diferentes composições (SIMÕES; SPITZER, 2007).

O uso de espécies de eucalipto para produção de madeira e de óleo essencial tem aumentado, apesar da maioria das áreas cultivadas em solo brasileiro ainda serem destinadas à produção de papel e de carvão. De acordo com Vitti e Brito (2003), as espécies *E. globulus* e *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex F. M. Bailey são as principais espécies cultivadas no Brasil para produção de óleo essencial, sendo que dentro do número de espécies de eucalipto existentes, pouco mais de 200 foram estudadas visando a caracterização do óleo essencial. Nesse sentido, estudos têm sido realizados a fim de ampliar a utilização de algumas espécies de eucalipto para a produção de óleo essencial (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006).

Além da obtenção de óleo essencial, as folhas podem ser utilizadas para a fabricação de diferentes extratos. E, a partir desses extratos, alguns estudos têm demonstrado as atividades terapêuticas atribuídas às espécies de eucaliptos. Dentre os compostos isolados, pode-se citar a inibição da ativação do vírus Epstein-Barr atribuída aos compostos Euglobal 1, Euglobal 2 e Euglobal 3 isolados de *E. grandis* e Euglobal T1 isolado de folhas jovens de *E. tereticornis* (KOKUMAL *et al.*, 1991; TAKASAKI *et al.*, 1990; PEREZ, 2003); a atividade anti-HIV-Rtase, apresentada pelos macrocarpais A-E de *E. globulus* (NISHIZAWA *et al.*, 1992); e a ação antibacteriana relacionada a Eucaliptona G, isolada a partir de *E. globulus* (MOHAMED; IBRAHIM, 2007).

O efeito antidiabético de extratos obtidos de exemplares do gênero *Eucalyptus* também tem sido verificado (MUKHERJEE *et al.*, 2006). Um extrato aquoso de *E. globulus* (0,5 g.L⁻¹) aumentou a utilização periférica da glucose no músculo abdominal de ratos e promoveu uma elevação gradual da secreção de insulina, a partir de uma linhagem clonal de células β -pancreáticas (GRAY; FLATT, 1998).

Recentemente, extratos e componentes isolados de algumas espécies de *Eucalyptus* têm demonstrado possuir atividades antitumorais. Cladocalol, um triterpeno formilado, foi isolado das folhas de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell. e apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem de células de leucemia mielóide (HL-60) (BENYAHIA *et al.*, 2005). O composto Euglobal-G1, um monoterpene derivado do floroglucinol e obtido das folhas de *E. grandis*, apresentou um efeito inibitório marcante sobre os dois estágios de carcinogênese em tumores de pele de rato induzidos por 7,12-dimetilbenz[α]antraceno (TAKASAKI *et al.*, 2000). Três novos

glicosídeos acilados a partir do fenol e do (+)-ácido oleuropeico, cipelocarpinas A, B e C, juntamente com sete compostos conhecidos, isolados das folhas de *Eucalyptus cypellocarpa* L.A.S. Johnson suprimiram dois estágios de carcinogênese induzida com óxido nítrico e acetato de 12-O-tetradecanoilforbol na pele de ratos (ITO *et al.*, 2000). Ashour *et al.* (2008) verificaram que os óleos essenciais obtidos a partir de caules de *Eucalyptus torquata* Leuhm. e folhas de *Eucalyptus sideroxylon* A. Cunn. ex Woolls possuem atividade citotóxica frente à linhagem celular de carcinoma mamário (MCF7). Al-Fatimi *et al.* (2005) investigaram 14 espécies de plantas usadas na medicina tradicional no Iêmen quanto a atividade citotóxica contra a linhagem celular de carcinoma de bexiga (ECV-304) e observaram que *E. camaldulensis* teve uma elevada atividade antitumoral. Estes estudos aumentam o interesse em investigar o efeito citotóxico de outras espécies de *Eucalyptus* contra células tumorais, com o propósito de ampliar as oportunidades terapêuticas contra o câncer.

3.4 *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CAMBAGE

A espécie *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage (FIGURA 02) é uma árvore originária da Austrália, mais especificamente da cidade de Camden. Tem uma distribuição limitada na costa leste de Nova Gales do Sul, sendo que a maior ocorrência é no sudoeste de Sydney, nas planícies do Rio Nepean e seus afluentes. Esse *táxon* é conhecido popularmente como *camden white gum* e apresenta bom desenvolvimento em planícies de rios ou ladeiras brandas (NISGOSKI, MUÑIZ; KLOCK, 1998).



FIGURA 02 – ASPECTO GERAL DO HÁBITO DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE
FONTE: O autor (2008)

Essa árvore foi classificada por Pryor e Johnson (1971) na série Viminales, subsérie Viminalinae, sendo que essa espécie é botanicamente próxima a *Eucalyptus dorrigoensis* (Blakely) L.A.S.Johnson & K.D.Hill e *Eucalyptus kartzoffiana* L.A.S. Johnson & Blaxell (BENSON, 1985).

É uma árvore considerada moderadamente alta (30 a 45 m), que apresenta excelente capacidade adaptativa e crescimento acelerado (BRONDANI, 2008). Na área de distribuição natural, o florescimento e a frutificação parecem variar consideravelmente entre os indivíduos. Os frutos maduros, de 4 a 5 mm de comprimento, podem ser colhidos durante os meses de abril a junho e de outubro a dezembro. Os botões florais podem ser visualizados durante todo o ano, com exceção do mês de fevereiro, enquanto as flores, de coloração branca (FIGURA 03), são encontradas de abril a maio (PRYOR, 1981).



FIGURA 03 – ASPECTO DAS FLORES DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE
FONTE: O autor (2008)

Na Austrália, *E. benthamii* está enquadrado como uma espécie vulnerável ao processo de extinção. Dessa forma, os principais interesses com relação a essa espécie estão voltados, sobretudo, para fins conservacionistas (NSW, 2000 BENSON; McDOUGALL, 1998; SEIDLICH; DOUGLAS; OCULUS, 1997). A área de distribuição da população de *E. benthamii* foi intensamente reduzida em virtude do aumento das atividades agrícolas e da construção da represa de Warragamba Dam, que inundou grande parte da população original (NSW, 2000). Dentre os principais eventos que ameaçam esta espécie destacam-se a concorrência com espécies introduzidas, incêndios, modificações nos regimes hídricos, ampliação das áreas urbanas e a intensa atividade agrícola na área de ocorrência natural (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005; NSW, 2000).

Na África do Sul, essa árvore é considerada promissora para plantios em regiões de geadas e foi incluída no programa de melhoramento do ICFR (*Institute for Commercial Forestry Research*) a partir de 1994 (HIGA; PEREIRA, 2003). Na China,

E. benthamii também tem apontado bons resultados na província de Yunnan, apesar de ter sido afetado pelo déficit hídrico (HIGA; PEREIRA, 2003).

Essa espécie foi introduzida no Brasil pela Embrapa Florestas (unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) no ano de 1988, em Colombo, no Paraná. Em plantios experimentais, a espécie tem apontado rápido crescimento, alta resistência a geadas (suportando temperaturas de até -6°C na fase inicial de desenvolvimento), boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999). Essas características tornam a espécie promissora como opção para reflorestamento em regiões nas quais ocorrem geadas frequentes e severas, como no sul do Brasil. No estado de Santa Catarina, *E. benthamii* vem apresentando tolerância a geadas e bom crescimento em plantios experimentais com dois e três anos. No estado de Minas Gerais, essa espécie tem demonstrado potencial para áreas montanhosas (HIGA, 1999). Em estudo realizado com representantes de *Eucalyptus*, *E. benthamii* tem sido a espécie de crescimento mais acelerado do gênero (HIGA; CARVALHO, 1990). Por todas essas razões, essa espécie tem sido considerada a nova protagonista do ciclo da madeira.

A utilização dessa espécie para a produção de madeira ainda está sendo avaliada, no entanto, parece ser uma árvore de grande potencial comercial (JOVANOVIĆ ; BOOTH, 2002). Os resultados referentes à qualidade da madeira sugerem o seu uso potencial para lenha, carvão e celulose. Porém, o emprego da madeira de *E. benthamii* para serraria não é adequado, pois apresenta empenamentos e rachaduras durante a secagem (HIGA; PEREIRA, 2003). Outros estudos consideram a madeira pertencente a essa espécie moderadamente dura, sendo adequada para o uso em locais protegidos (NISGOSKI, MUÑIZ; KLOCK, 1998).

A espécie *E. benthamii* foi descrita da seguinte forma:

A casca persistente é fina, compacta e tende a formar pequenas tiras longitudinais, as quais são aderentes apenas em parte. Folhas velhas opostas, sésseis, os primeiros dois a quatro pares elípticos a ovais; glândulas proeminentes espalhadas na folha e conspícuas no pecíolo. Folhas jovens opostas, sésseis, largamente oblongo ovadas a ovadas, subglaucas, textura moderadamente fina. Folhas intermediárias opostas a subopostas, sésseis ou com pequena haste, lanceoladas; verdes, textura moderadamente fina. Folhas adultas (FIGURA 04) alternas, longas hastes, lanceoladas; verdes, algumas com textura fina. Inflorescência axilar, 4-7 flores, pedúnculos com 0,5 cm de comprimento, pedicelos com 0,25 cm. Botão oval a clavado, no sul, forma opérculos hemisféricos e subglaucos, no norte, apresenta forma cônica e dificilmente glauco. Fruto hemisférico a campanulado, subglauco quando imaturo; disco estreito, levemente convexo ou mais ou menos iguais, 3-4 valvas (Nisgoski; Muñiz; Klock, 1998, p. 69).

Os estudos relativos a essa espécie são relacionados principalmente a aspectos agro-florestais. São escassas as pesquisas com abordagens fitoquímicas e/ou medicinais a partir de óleos essenciais ou de extratos obtidos de *E. benthamii*. Silva, Brito e Silva Júnior (2006) investigaram o potencial de algumas espécies de eucalipto para obtenção de essência. Nesse trabalho, foi verificado um teor de 0,40% e 0,35% de óleo volátil de *E. benthamii*, extraído de folhas frescas colhidas nos meses de outono e verão, respectivamente. Os principais componentes do óleo volátil dessa espécie foram determinados, sendo o α -pineno o constituinte majoritário. Concentrações de 47,6, 26,4, 24,2 e 34,7% de α -pineno foram identificadas no óleo essencial extraído a partir do material foliar colhido nos meses de outono, inverno, primavera e verão, respectivamente. Outro estudo envolvendo a subespécie *Eucalyptus benthamii* var *benthamii* apontou uma atividade larvicida/adulticida contra exemplares do mosquito *Aedes aegypti* a partir do óleo essencial (LUCIA *et al.*, 2011). Mossi e colaboradores (2011) avaliaram a composição química, a atividade inseticida e o potencial repelente dos óleos essenciais de *E. benthamii*, *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. globulus*, *Eucalyptus viminalis* Labill. e *Eucalyptus saligna* Sm. contra *Sitophilus zeamais* em grãos de milho. Os compostos α -pineno (54%), 1,8-cineol (9,9%), viridiflorol (17,1%) e aromadendreno (7,3%) foram identificados como majoritários para o óleo essencial de *E. benthamii*, obtido a partir da extração de folhas colhidas no verão em Erechim, Rio Grande do Sul. Esse óleo volátil também apresentou efeitos inseticidas e repelentes. Tian *et al.* (2005) indicou os terpenos α -pineno (31%), globulol (15,34%), aromadendreno (13,8%) e *epi*-globulol (4,86%) como constituintes principais do óleo volátil de *E. benthamii* obtido a partir de amostras foliares coletadas na China.



FIGURA 04 – ASPECTO DAS FOLHAS ADULTAS DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE,
MYRTACEAE
FONTE: O autor (2008)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLVENTES

4.1.1 Fármacos

- Acetato de dexametasona (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Sulfato de vincristina (Zodiac, Brasil).

4.1.2 Terpenos

- α -pineno (pureza de 96,8%, Geroma do Brasil, Brasil);
- γ -terpineno (pureza de 96,9%, Geroma do Brasil, Brasil);
- terpinen-4-ol (pureza $\geq 98,5\%$, soma de enantiômeros, Sigma Chemical, Estados Unidos).

4.1.3 Materiais usados no cultivo celular

- Acetato de sódio P.A. (Vetec, Brasil);
- α -Naftiletilenodiamina (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Azul de Tripan (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Bicarbonato de sódio P.A. (Vetec, Brasil);
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT) (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Cloreto de potássio P.A. (Vetec, Brasil);
- Cloreto de sódio P.A. (Vetec, Brasil);
- Difenilamina (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Dimetilsufóxido (DMSO) P.A. (Vetec, Brasil);
- Formaldeído (Merck Biosciences, Alemanha);

- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. (Synth, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Synth, Brasil);
- Kit LDH UV-PP (Analisa, Brasil);
- *Lipopolysaccharides* de *Escherichia coli* 055:b5 (LPS) (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Meio RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil);
- Penicilina/Estreptomicina (Vitrocell, Brasil);
- Propilenoglicol P.A. (Vetec, Brasil);
- Soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil);
- Sulfanilamida (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Triton X-100[®] (Sigma Chemical, Estados Unidos).

4.1.4 Corantes

- Eosina (Vetec, Brasil);
- Hematoxilina (Vetec, Brasil).

4.1.5 Outros reagentes e solventes

- Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Acetona P.A. (Vetec, Brasil);
- Ácido acético glacial P.A. (Vetec, Brasil);
- Álcool etílico P.A. (99,8% de pureza, Synth, Brasil);
- Dimetilformamida P.A. (Vetec, Brasil);
- Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Peróxido de hidrogênio P.A. (Vetec, Brasil);
- Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Chemical, Estados Unidos).

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada na Fazenda de Transferência de Tecnologia da Embrapa, na região de Ponta Grossa, estado do Paraná (altitude: 926 m, latitude: 25°10'09" S e longitude: 50°03'44" O). Foram selecionadas oito árvores de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage para efetuar as coletas. Todas as coletas foram realizadas entre as 9 e 10 h da manhã. As folhas foram coletadas durante as quatro estações do ano de 2010.

As exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UPCB) sob o número 59440, com identificação realizada pelo taxonomista Olavo Guimarães e no Museu Botânico Municipal, sob o número 350231 e identificação do taxonomista Osmar dos Santos Ribas.

4.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*

4.3.1 Extração do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage

A extração do óleo essencial das folhas dessecadas foi realizada por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXII, 1990), com duração de 6 h. Após esse tempo, o material obtido foi estocado em tubos de vidro âmbar, selados, em temperatura de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para a realização de todas as atividades biológicas, foi empregado o óleo essencial obtido a partir da extração de folhas coletadas durante o verão. As diluições do óleo essencial empregadas para todos os experimentos foram obtidas a partir de cálculos baseados na densidade.

4.3.2 Identificação dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa

A identificação dos constituintes voláteis das espécies foi realizada por meio do cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 equipado com o detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975 e coluna de capilaridade HP-5MS (30 mm x 0,25 mm x 0,25 μ m). A temperatura do injetor foi de 220 °C, sendo da coluna 60 °C, com rampa de aquecimento de 3 °C.min⁻¹, temperatura final 240 °C e temperatura do auxiliar 250 °C. O hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL.min⁻¹. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados pela comparação com dados da literatura e perfis da biblioteca NIST-05. A análise quantitativa foi efetuada por FID (detector de ionização por chama - *flame ionization detector*) nas mesmas condições analíticas descritas anteriormente.

4.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

4.4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços (25-35 g) de aproximadamente 90 dias. Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, em temperatura de 22 \pm 2°C, em ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso à água e ração. Os animais foram conduzidos ao laboratório de experimentação pelo menos uma hora antes do início dos experimentos. Os testes foram desenvolvidos com quatro grupos experimentais, sendo que de acordo com o planejamento estatístico, foi definida a necessidade da utilização de cinco animais por grupo. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal do Paraná sob o número 482.

4.4.2 Avaliação do edema de orelha

A avaliação do edema de orelha foi realizada mediante o método revisado por Hecker e Schimdt (1974). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma, com auxílio de um micrômetro digital (Great, MT-04513). A espessura foi registrada em micrômetros e os dados foram expressos como o aumento da espessura da orelha. O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador. O óleo essencial das folhas adultas, o α -pineno e o agente flogístico foram dissolvidos em um volume de 20 μ L de acetona e aplicados na orelha direita de cada camundongo.

Para o ensaio de edema de orelha, o óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* foi testado nas doses de 0,03 mg/orelha a 1 mg/orelha, enquanto o terpeno α -pineno foi avaliado nas doses de 0,1 mg/orelha a 1 mg/orelha.

4.4.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA

O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μ g.20 μ L⁻¹ de TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) na orelha direita de camundongos. As amostras e os controles foram aplicados topicamente, após o tratamento com TPA. Como controle positivo foi usado dexametasona (0,05 mg/orelha), e no teste do controle negativo foi aplicado apenas TPA. A espessura da orelha foi avaliada antes (basal) e após 6 h da aplicação do TPA (DE YOUNG *et al.*, 1989). Após 24 h da aplicação do TPA, círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos foram coletados e submetidos à avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase e à análise histológica.

4.4.3 Atividade da enzima mieloperoxidase

A atividade enzimática da mieloperoxidase foi avaliada de acordo com a metodologia de Bradley *et al.* (1982) modificada por De Young *et al.* (1989). Aos círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos foram adicionados 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mmol.L⁻¹ e pH 5,4, contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), e homogeneizado por aproximadamente 45 s a 0 °C. O homogenato foi decantado em microtubos e a eles adicionados 0,75 mL da solução de fosfato de sódio já descrita. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram depositadas em placas de 96 poços e, em seguida, foram adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de solução de fosfato de sódio 80 mmol.L⁻¹ (pH 5,4), 85 µL de PBS 0,22 mol.L⁻¹ (pH 5,4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação teve início pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mmol.L⁻¹, dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37 °C por 3 min e a reação foi interrompida pela adição, em cada poço, de 30 µL de acetato de sódio 1,46 mol.L⁻¹ (pH 3,0). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) com comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

4.4.4 Análise histológica

As amostras de orelhas coletadas de camundongos e submetidas à aplicação tópica de TPA foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool etílico 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por um período de 16 h, sendo, em seguida, conservadas em álcool 70% até o início do processo de desidratação. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente e emblocadas em parafina. Foram realizadas secções transversais de 3-4 µm de espessura, as quais foram coradas por hematoxilina e eosina (RECIO *et al.*, 2000). A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* E DO α -PINENO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA *EX VIVO* DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO

4.5.1 Obtenção dos macrófagos peritoniais de camundongo

Para obtenção dos macrófagos, os animais foram eutanasiados por decaptação. Após assepsia da região abdominal com etanol 70% e exposição do peritônio, aproximadamente 10 mL de PBS foram injetados na cavidade peritoneal com auxílio de seringa e agulha estéreis. Na sequência, foi realizada uma massagem na região abdominal do animal e o exsudato peritoneal foi aspirado (utilizando pipetas *Pasteur* descartáveis) e transferido para um tubo cônico (tipo falcon) estéril. O exsudato coletado foi mantido em banho de gelo, sendo na sequência lavado três vezes com PBS gelado e centrifugado (1500 rpm por 8 min). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspensionado em 10 mL de meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SFB. Uma alíquota dessa suspensão foi utilizada para contagem total das células, realizada com azul de Tripán.

4.5.2 Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e do α -pineno em macrófagos de camundongo

Os macrófagos peritoneais foram semeados em placas de 96 poços (4×10^5 células/poço). Após a adesão de duas horas, as células foram lavadas com PBS e na sequência foram adicionados 100 μ L de meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações (5, 10 e 20 μ g.mL⁻¹) do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e do α -pineno sobre as células aderidas. As células foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e sobre as células foi adicionada uma solução de brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT) a 0,5 mg.mL⁻¹ em meio de cultivo (RPMI 1640) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Cabe ressaltar que o método do MTT é empregado para determinar a habilidade de células vivas em reduzir MTT formando cristais insolúveis de

formazan de coloração violeta (MOSMANN, 1983). Na sequência, as culturas foram novamente incubadas a 37°C e ao abrigo da luz durante 60 min, tempo em que se observou a presença dos cristais de formazan. Para a solubilização dos cristais de formazan, o dimetilssulfóxido (DMSO) foi acrescentado sobre as células e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550 nm, foi realizada em leitor de placas (Biotek, µQuant).

4.5.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi estimada de maneira indireta através da quantificação do nitrito, produto estável da conversão do óxido nítrico, utilizando-se o método colorimétrico de Griess (DING; NATHAN; STUEHR, 1988). Resumidamente, os macrófagos peritoneais foram semeados em placas de 96 poços (4×10^5 células/poço), e colocados para aderir durante duas horas. Após a adesão, as células foram lavadas com PBS. Na sequência foram adicionados sobre as células aderidas 100 µL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB contendo diferentes concentrações (5, 10 e 20 µg.mL⁻¹) do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e do α-pineno. A produção de NO pelos macrófagos foi estimulada pela adição de 100 µL de meio RPMI 1640 com 10% de SFB e acrescido de 10 µg.mL⁻¹ de LPS. As células foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após a incubação das células, 100 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços. Um volume de 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%, V/V, em água destilada mais α-naftiletilenodiamina 0,1%, em água destilada) foi acrescentado aos sobrenadantes e a absorbância foi determinada a 550 nm em espectrofotômetro.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. benthamii* E DOS TERPENOS α -PINENO, γ -TERPINENO e TERPINEN-4-OL SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

As linhagens celulares B16F10, HeLa, Jurkat e J774A.1 foram cultivadas rotineiramente em garrafas de 25 ou 75 cm² com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 24 mmol.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e antibiótico (penicilina 10000 UI e estreptomicina 10 mg.mL⁻¹). As garrafas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células J774A.1 e Jurkat foram cedidas pela Profa. Dra Carla Cristine Kanunfre e as linhagens celulares B16F10 e HeLa foram cedidas pelo Prof. Dr. Michel Fleith Otuki e pela Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Além do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*, foram testados os compostos α -pineno, terpinen-4-ol e γ -terpineno. Imediatamente antes de cada experimento uma solução a 100 mg.mL⁻¹ de cada amostra foi obtida a partir da dissolução em um veículo contendo 75% de álcool etílico absoluto e 25% de propilenoglicol (VIRADOR *et al.*, 1999). A partir dessa solução a 100 mg.mL⁻¹, as amostras foram diluídas nas concentrações finais utilizando meio de cultivo RPMI 1640. A concentração final do veículo em cultura não ultrapassou 0,3%. Em todos os experimentos foi utilizado como controle negativo o meio RPMI 1640 contendo a mesma concentração do veículo utilizado para diluir as amostras.

4.6.1 Cultura de células Jurkat – Modelo de linfócitos T de origem leucêmica

Este tipo celular é derivado do tecido hematopoiético da gordura marrom de uma paciente com leucemia e uma de suas características é a produção de IL-2 e interferon γ (GILLIS; WATSON, 1980). Os ensaios realizados para determinação da citotoxicidade do óleo essencial das folhas adultas e jovens de *E. benthamii* e dos compostos isolados com a linhagem celular Jurkat estão descritos a seguir.

4.6.1.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

As células, em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram semeadas em placas de 24 poços ($0,25 \times 10^5$ células/poço) e mantidas sob condições de cultura (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2) por 24 h. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações dos óleos essenciais e dos terpenos (3, 10, 30, 100 e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição das amostras em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 . Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e às células foi adicionado uma solução de MTT a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 30 min e ao abrigo da luz. Para a solubilização dos cristais de formazan, produto da redução do MTT, o dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550 nm, foi realizada em leitor de placas (Biotek, μQuant). Meio RPMI 1640 e vincristina a 40 nmol.L^{-1} ou $36,92 \text{ ng.mL}^{-1}$ foram empregados como controles negativo e positivo, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pela comparação dos valores de absorbância obtidos para células tratadas e não tratadas. A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que induziu morte celular em 50% das células (IC_{50}) e foi calculada por regressão de Probit.

4.6.1.2 Ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul de Tripan

Este método avalia a integridade da membrana celular (MERCHANT, KAHN e MURPHY, 1964). As células, em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram semeadas em placas de 24 poços ($0,25 \times 10^5$ células/poço) e mantidas sob condições de cultura por 24 h. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações dos óleos essenciais e dos terpenos (3, 10, 30, 100 e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição das amostras em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 . Após esses períodos de incubação, uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ da suspensão de células,

devidamente homogeneizada, foi retirada e diluída em azul de Tripán (0,4% em PBS). As células foram observadas e contadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. O azul de Tripán penetra no interior de células que perderam a integridade da membrana. As células consideradas viáveis apresentaram-se íntegras, redondas e incolores, ao passo que, as células não-viáveis apresentaram-se coradas em azul.

4.6.1.3 Ensaio de viabilidade celular avaliado pela liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A fim de quantificar a enzima lactato desidrogenase (LDH), liberada no citosol, após a perda da integridade da membrana, as células Jurkat (1×10^6 células), em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram semeadas em tubos tipo *Eppendorf* e tratadas por 4 h com as amostras na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (diluídas em meio RPMI 1640 livre de SFB) a 37°C e 5% de CO_2 . A determinação da atividade da LDH, que é proporcional ao número de células lisadas por processo necrótico, foi mensurada pelo emprego do kit LDH UV-PP (Analisa). Como controle positivo foi utilizado 0,1% de Triton X-100 (Sigma[®]) para lise celular total. Meio RPMI 1640 sem SFB foi empregado como controle negativo. Os valores de absorbância foram aferidos em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm.

4.6.1.4 Análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

Para analisar se houve fragmentação do DNA provocada pelas amostras, foi realizado o protocolo descrito por Nicoletti e colaboradores (1997). As células, em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e mantidas sob condições de cultura por 24 h. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações do óleo essencial das folhas adultas e jovens e do terpeno terpinen-4-ol (50, 100 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição das amostras em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Após mais 24 h de cultura (tempo do tratamento), o conteúdo de cada poço foi centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet*

celular foi lavado com PBS gelado. Na sequência, foi retirado o sobrenadante e sobre o *pellet* celular foram adicionados 200 μL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100® e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de iodeto de propídio em PBS). Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados por 24 h a 4°C. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) no canal FL2-H. Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa CellQuest (Becton & Dickinson) avaliando 20.000 eventos por amostra.

O tampão hipotônico, ou de lise, rompe a membrana celular permitindo que o iodeto de propídeo se ligue ao DNA, intercalando-se entre as bases. Ao ligar-se ao DNA de células íntegras, o iodeto de propídeo emite fluorescência alta, e quando da ligação a fragmentos de DNA de células não íntegras há emissão de fluorescência baixa (ZAMAI *et al.*, 1996).

4.6.1.5 Análise do conteúdo de DNA celular

O efeito dos tratamentos sobre a proliferação celular foi avaliado por meio da análise do conteúdo de DNA. As células ($1,5 \times 10^5$ células/mL), em meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SFB, foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 h sob condições de cultura, foram adicionados os tratamentos nas concentrações de 3, 30 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SFB e as placas foram levadas a incubação por 48 h a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 . Após esse período, as suspensões de células referentes a cada tratamento foram coletadas e centrifugadas a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e, sobre o precipitado celular, foi adicionada uma solução de difenilamina (1,5% em ácido acético e 0,1% de acetaldeído) e mantido em contato com o precipitado pelo período de 24 h ao abrigo da luz. Determinou-se a absorbância a 575 nm em espectrofotômetro (SELLITTI *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em porcentagem de conteúdo de DNA celular. Meio RPMI 1640 com 10% de SFB e vincristina a 40 nmol.L^{-1} foram empregados como controles negativo e positivo, respectivamente.

4.6.1.6 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Para analisar se houve alteração do ciclo celular, foi executado o protocolo descrito por Nicoletti e colaboradores (1997), conforme descrito no item 4.6.1.4. Nesse sentido, avaliou-se a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) no canal FL2-H. Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa CellQuest (Becton & Dickinson) avaliando 20.000 eventos por amostra.

4.6.2 Cultura das demais células de origem tumoral

HeLa – Modelo de células epiteliais de carcinoma de cérvix uterino humano - As células HeLa são oriundas de uma paciente com carcinoma epidermóide da cérvix uterina (KLEIN *et al.*, 1999).

B16F10 - Modelo de melanoma murino - As células B16F10 são melanócitos extraídos a partir de melanoma de pele de camundongos.

J774A.1 – Modelo de macrófagos de origem tumoral - J774A.1 são células imortalizadas, linhagem de modelo de macrófagos derivados de sarcoma de células reticulares de ascite de camundongo, largamente empregadas para avaliação de atividade imunomoduladora *in vitro*.

A citotoxicidade dos diferentes tratamentos frente às células tumorais foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular empregando-se o método de redução do MTT.

4.6.2.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

As células, em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços ($0,25 \times 10^5$ células/poço) e mantidas sob condições de cultura por 24 h. Na sequência, foram adicionadas diferentes concentrações (3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) das amostras sobre as células aderidas. Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição das amostras em meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de

SFB. As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e às células foi adicionada uma solução de MTT a 0,5 mg.mL⁻¹. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 30 min, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazan. Para a solubilização dos cristais de formazan, dimetilssulfóxido (DMSO) foi acrescentado e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550 nm, foi realizada em leitor de placas (Biotek, µQuant).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises estatísticas relativas à composição química dos óleos voláteis foram efetuadas em cooperação com a Profa. Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, do Departamento de Química da UFPR. O processamento dos dados foi realizado usando o software Origem Pro 6.1 (OriginLab). A análise de Componentes Principais (PCA) foi obtida por meio do software Matlab 6.5 (Math Work Inc.). PCA é um método capaz de analisar as semelhanças e diferenças entre diferentes populações e os constituintes químicos de seus óleos essenciais. Antes da análise multivariada, os dados foram pré-processados por meio do autoescalamamento. No total, 29 compostos químicos foram analisados em cinco amostras. A análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) examina as distâncias entre as amostras em um conjunto de dados e a informação é então representada em um dendrograma. A HCA foi realizada empregando a distância do vizinho mais próximo e a distância de Mahalanobis, utilizando PCA (dois componentes principais).

As demais análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo que, quando necessário, foi empregado o teste *post hoc* de Tukey e Newman Keuls. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e média ± desvio padrão (DP). Valores de P menores do que 0,05 (P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*

As folhas de *E. benthamii* foram coletadas durante as quatro estações do ano de 2010. Em face da presença de heterofolia nas espécies do gênero *Eucalyptus*, as folhas jovens foram segregadas das folhas adultas e as extrações foram efetuadas separadamente com o objetivo de verificar possíveis diferenças químicas. Somente no verão foi possível observar a presença de folhas jovens nas árvores.

Durante o processo de extração por meio do aparato de Clevenger, foi observado que os óleos essenciais extraídos de folhas de *E. benthamii* possuem uma densidade menor do que a densidade da água, uma coloração amarelo claro e um odor característico, bastante pronunciado.

A composição química dos óleos essenciais de folhas jovens (OEFJ) e adultas (OEFA) de *E. benthamii* da coleta de verão está apresentada na Tabela 01 e os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 05 a 10. Ambos os óleos voláteis consistiram de uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos. Os principais compostos identificados para o óleo essencial das folhas jovens de *E. benthamii* foram α -pineno (36,82%), globulol (20,54%), aromadendreno (15,94%) e γ -terpineno (5,51%). O óleo volátil extraído das folhas adultas foi composto principalmente por α -pineno (36,92%), globulol (20,22%), aromadendreno (12,40%) e γ -terpineno (4,38%). No entanto, algumas diferenças na composição quantitativa destes óleos essenciais foram particularmente relacionadas com os seus compostos minoritários. Tem sido amplamente relatado que as espécies de *Eucalyptus* apresentam heterofilia, que produz folhas jovens e adultas diferindo significativamente na morfologia e anatomia (GRAS *et al.*, 2005). Consequentemente, diferenças na via biossintética também podem ocorrer e levar a uma ampla gama de reações do metabolismo dos terpenos (MAHMOUD; CROTEAU, 2001) que influenciam na composição volátil final. Além disso, *E. benthamii* revelou algumas mudanças específicas na composição química de seus óleos essenciais, em comparação com outras espécies de eucalipto, uma vez que continha apenas traços de 1,8-cineol e uma concentração relativamente alta de α -pineno.

TABELA 01 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

Compostos	TR	IR	Área do pico (%)		Identificação
			OEFJ	OEFA	
α -pineno	4.90	935	36,82	36,92	IR, EM
β -pineno	5.90	977	nd	0,48	IR, EM
<i>p</i> -cimeno	7.27	1024	1,59	1,90	IR, EM
limoneno	7.39	1028	0,81	0,90	IR, EM
γ -terpineno	8.38	1058	5,51	4,38	IR, EM
M = 136	9.85	1102	nd	0,60	IR, EM
(<i>E</i>)-pinocarveol	11.29	1138	nd	0,84	IR, EM
terpinen-4-ol	12.82	1177	1,23	1,05	IR, EM
α -terpineol	13.39	1192	1,32	2,02	IR, EM
α -gurjuneno	22.25	1406	1,70	1,29	IR, EM
aromadendreno	23.50	1437	15,94	12,40	IR, EM
<i>allo</i> -aromadendreno	24.30	1457	1,98	1,48	IR, EM
viridifloreno	25.69	1492	1,47	1,13	IR, EM
M = 222	28.24	1558	4,98	4,97	IR, EM
M = 204	28.45	1563	1,07	0,99	IR, EM
globulol	29.25	1584	20,54	20,22	IR, EM
viridiflorol	29.47	1590	1,63	3,13	IR, EM
rosifoliol	29.84	1599	1,63	1,60	IR, EM
M = 218	30.34	1613	nd	0,82	IR, EM
10- <i>epi</i> - γ - eudesmol	30.59	1620	1,78	1,64	IR, EM
M = 222	31.78	1652	nd	0,98	IR, EM
Compostos identificados					
Monoterpenos hidrocarbonetos			44.73	44.58	
Monoterpenos oxigenados			2.55	3.91	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			21.09	16.3	
Sesquiterpenos oxigenados			25.58	26.59	

NOTA: OEFJ= óleo essencial das folhas jovens
 OEFA= óleo essencial das folhas adultas
 TR: tempo de retenção em minutos
 IR: índice de retenção
 EM: espectro de massas
 nd: não detectado

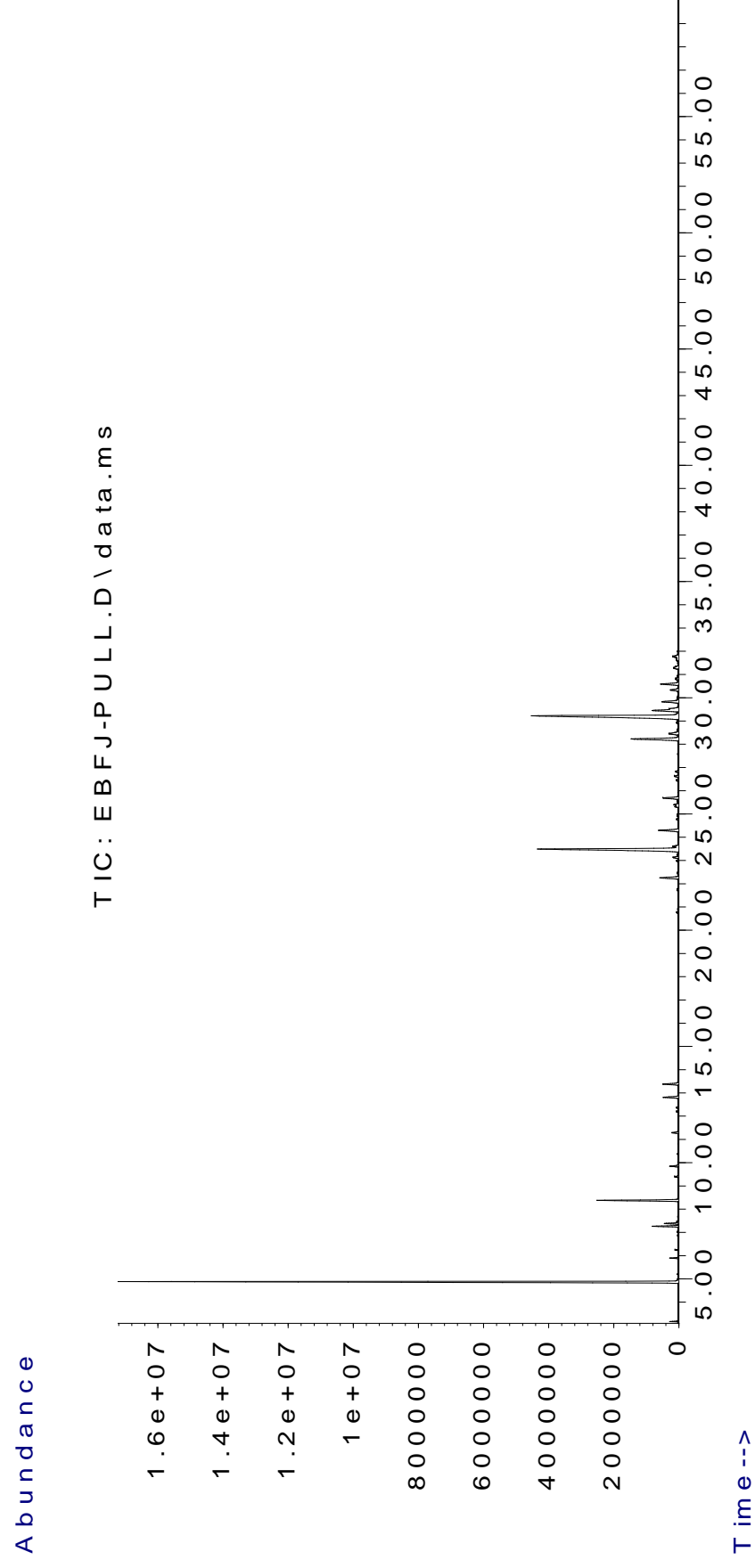


FIGURA 05 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

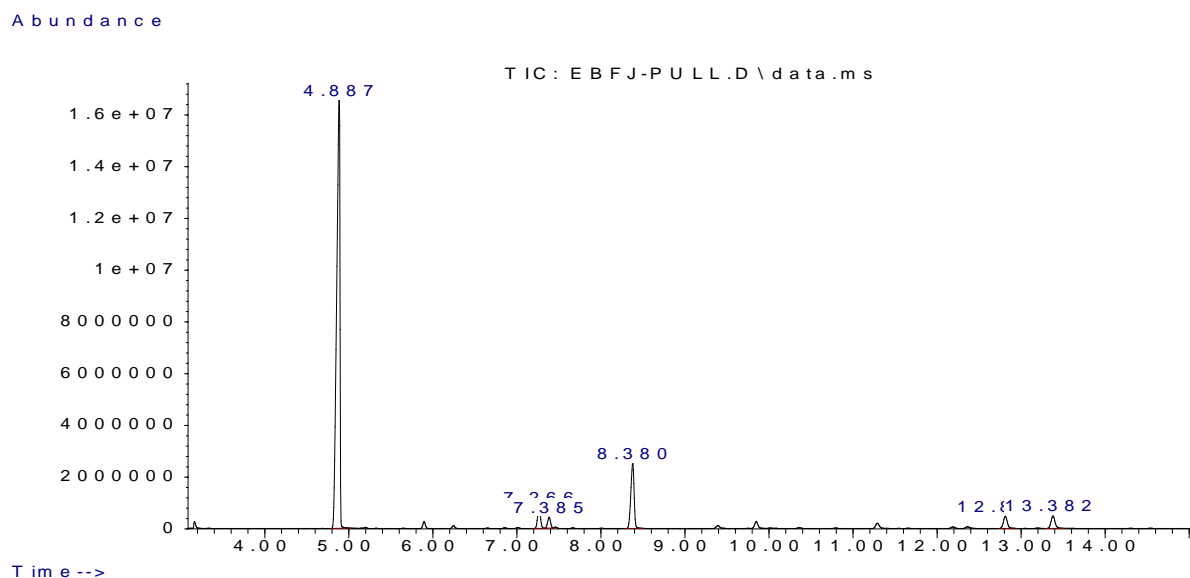


FIGURA 06 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (3-15 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

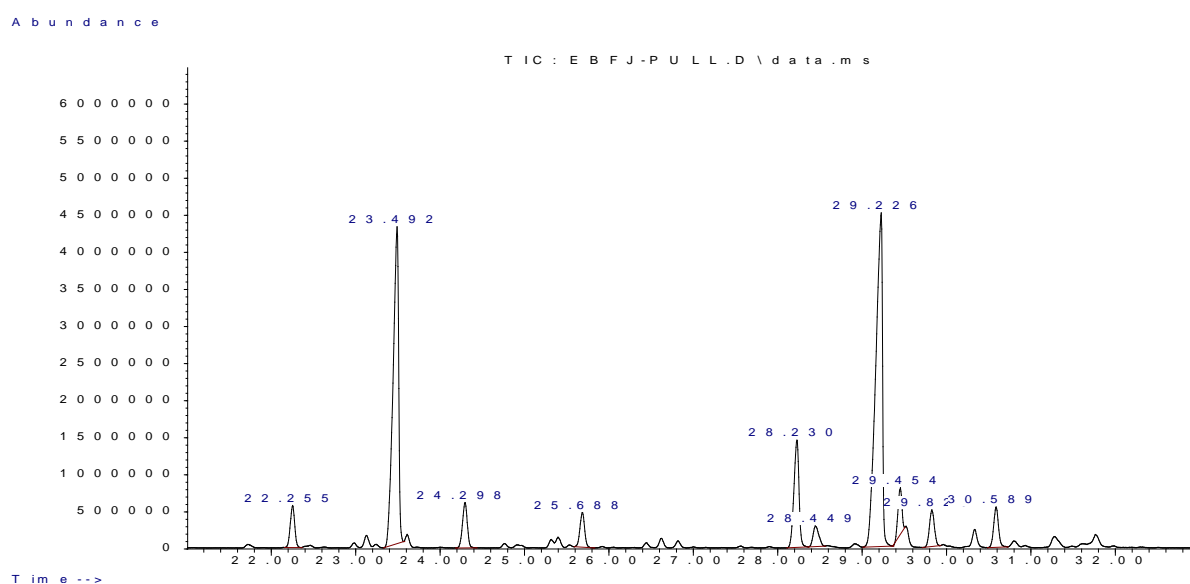


FIGURA 07 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (21-33 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

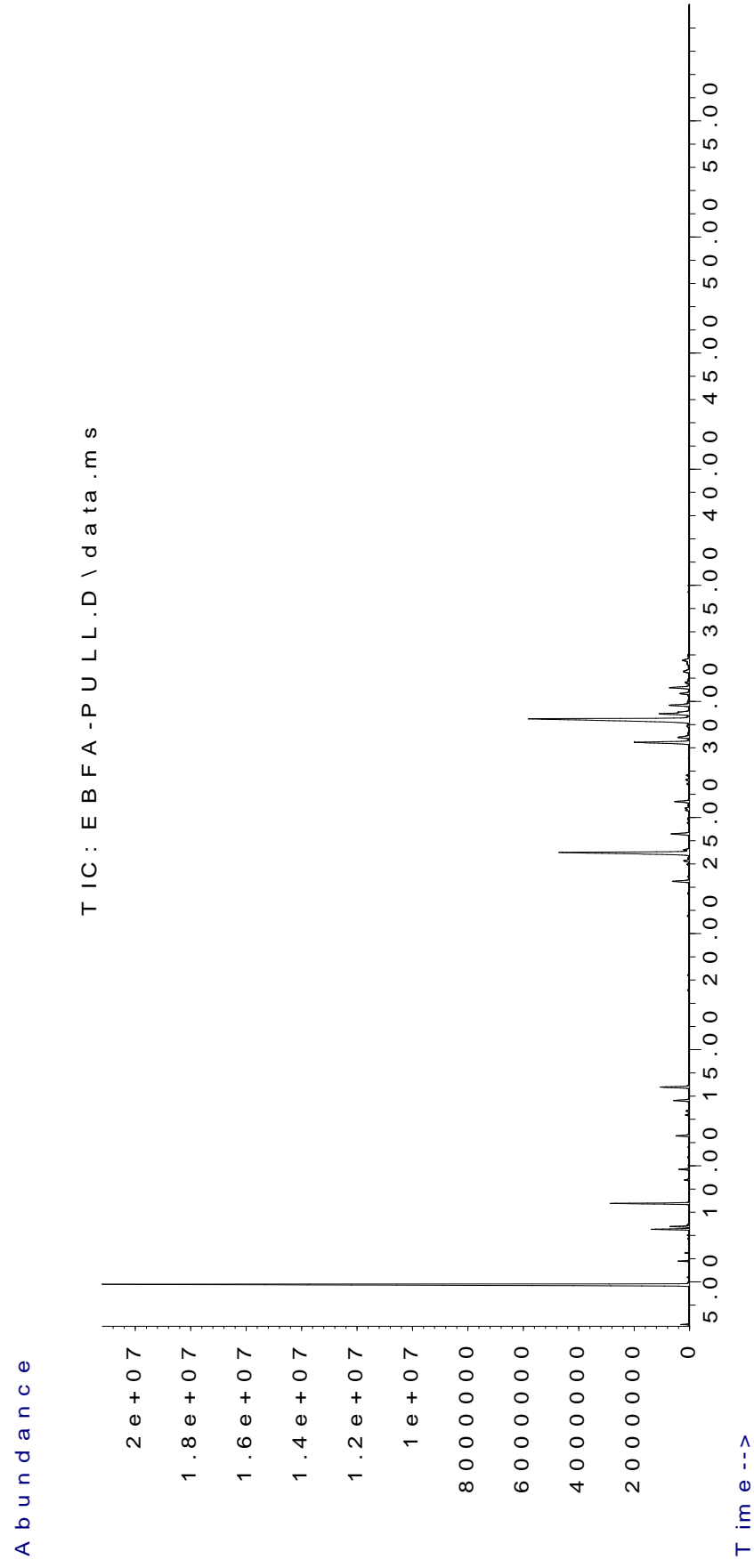


FIGURA 08 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

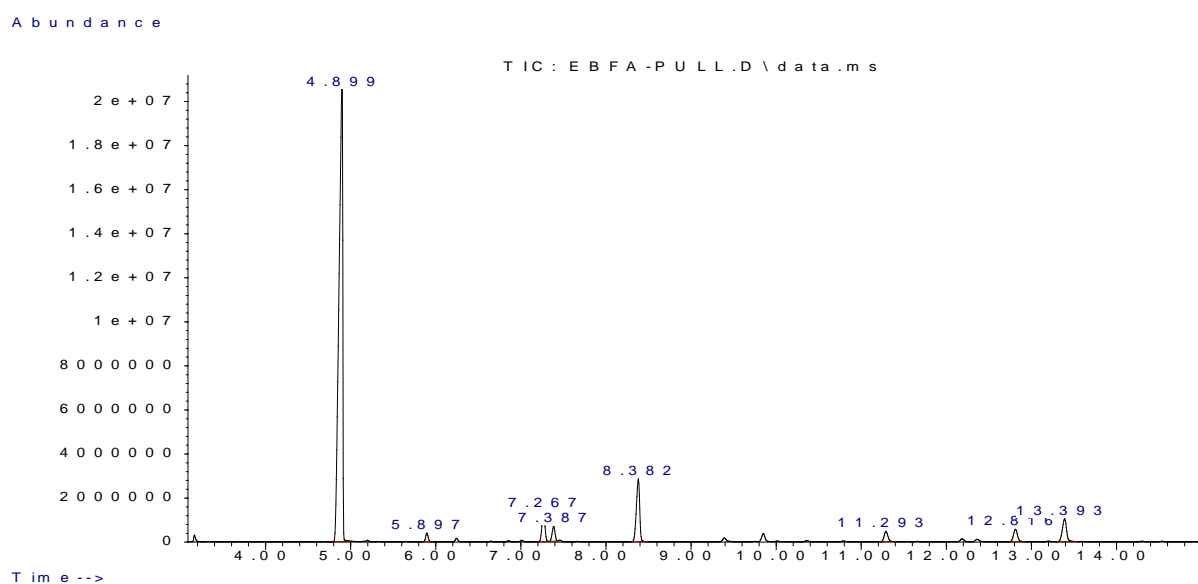


FIGURA 09 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (3-15 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

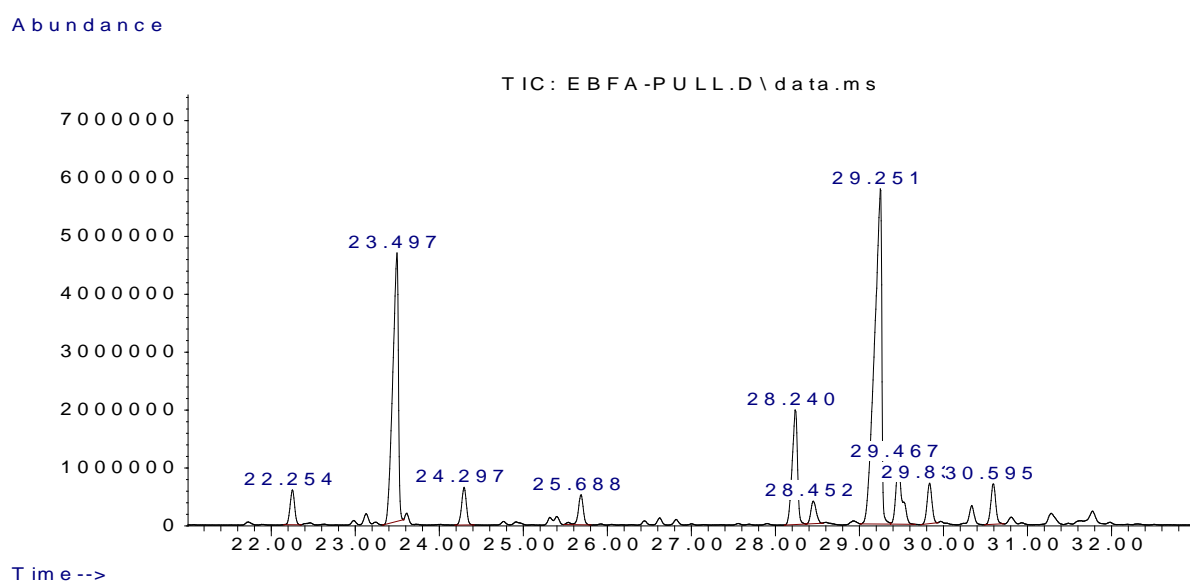


FIGURA 10 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (21-33 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE VERÃO

Os principais constituintes do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* da coleta de outono estão compilados na Tabela 02 e os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 11 a 13. O monoterpeno α -pineno (38,63%) foi o principal composto determinado para esta coleta, seguido dos compostos globulol (17,73%), aromadendreno (14,87%), viridiflorol (2,87%) e γ -terpineno (2,72%).

Os componentes químicos do óleo volátil extraído das folhas adultas de *E. benthamii* da coleta de inverno estão sumarizados na Tabela 03 e os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 14 a 16. O componente majoritário estabelecido para as amostras dessa coleta foi o α -pineno (33,64%), seguido dos compostos globulol (19,51%), aromadendreno (13,49%), (*E*)-pinocarveol (3,87%) e *p*-cimeno (3,62%).

A composição química do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* da coleta de primavera está apresentada na Tabela 04 e os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 17 a 19. O monoterpeno α -pineno (31,56%) foi o principal composto verificado para essa coleta. Os demais constituintes prevalentes foram globulol (20,37%), aromadendreno (13,94%), (*E*)-pinocarveol (4,43%) e viridiflorol (3,16%).

TABELA 02 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE OUTONO

Compostos	TR	IR	Área do pico (%)	Identificação
α -pineno	6,03	937	38,63	IR, EM
β -pineno	7,15	978	0,55	IR, EM
<i>p</i> -cimeno	8,65	1025	2,08	IR, EM
limoneno	8,78	1029	1,18	IR, EM
γ -terpineno	9,86	1058	2,72	IR, EM
linalol	11,40	1101	0,38	IR, EM
(<i>E</i>)-pinocarveol	12,98	1139	1,62	IR, EM
M = 150	13,92	1162	0,45	IR, EM
terpinen-4-ol	14,54	1177	0,72	IR, EM
α -terpineol	15,13	1192	2,34	IR, EM
α -gurjuneno	24,27	1408	0,60	IR, EM
β -gurjuneno	25,18	1431	0,53	IR, EM
aromadendreno	25,55	1440	14,87	IR, EM
M = 204	25,65	1442	0,42	IR, EM
<i>allo</i> -aromadendreno	26,35	1460	1,71	IR, EM
γ -selineno	27,72	1493	0,45	IR, EM
M = 222	30,29	1560	4,71	IR, EM
maaliol	30,53	1566	0,93	IR, EM
globulol	31,31	1586	17,73	IR, EM
viridiflorol	31,54	1592	2,87	IR, EM
rosifoliol	31,90	1601	1,47	IR, EM
M = 218	32,41	1615	0,85	IR, EM
M = 222	32,67	1622	1,45	IR, EM
α -cadinol	33,84	1654	0,76	IR, EM
Compostos identificados				
Monoterpenos hidrocarbonetos			45,16	
Monoterpenos oxigenados			5,06	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			18,16	
Sesquiterpenos oxigenados			23,76	

NOTA: TR: tempo de retenção em minutos

IR: índice de retenção

EM: espectro de massas

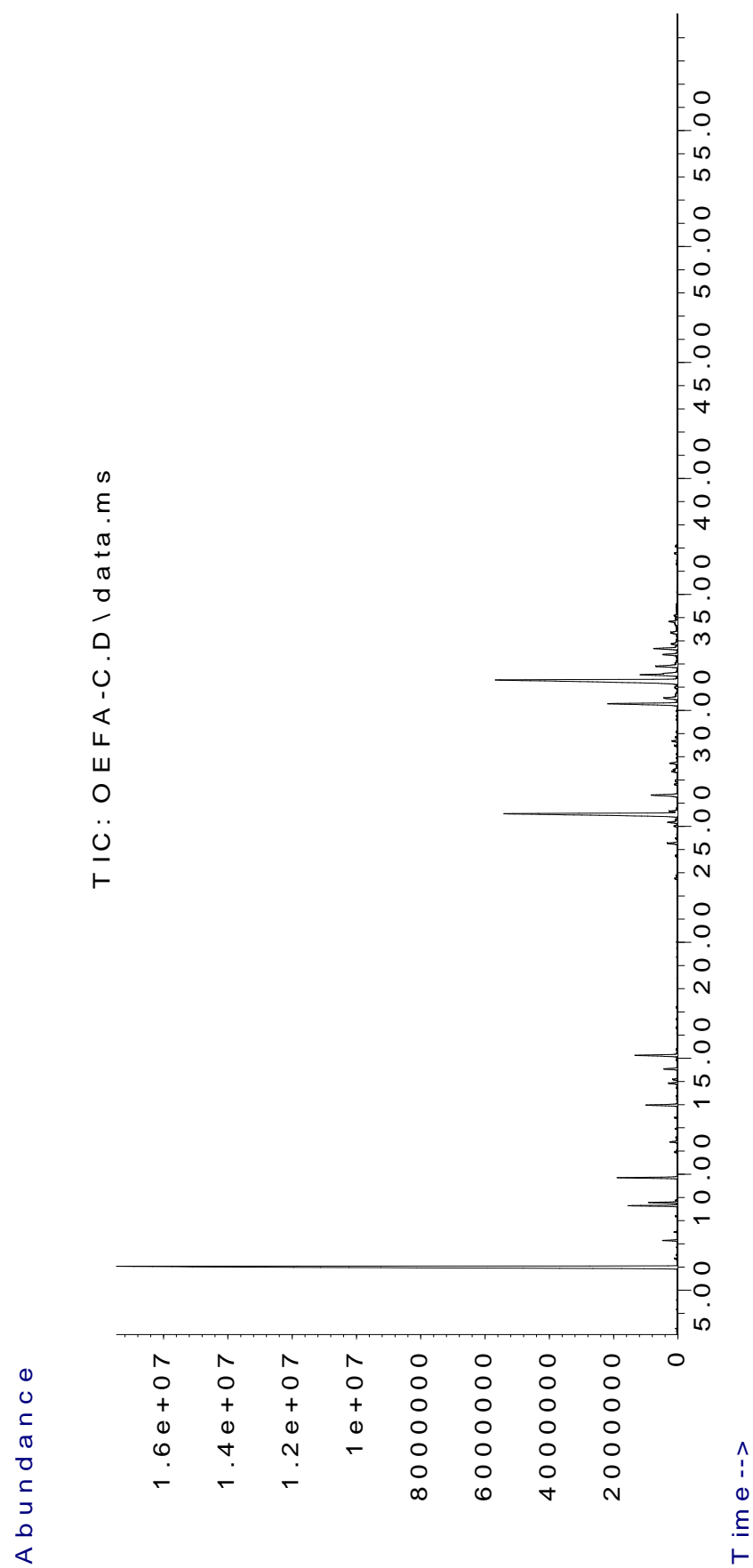


FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE OUTONO

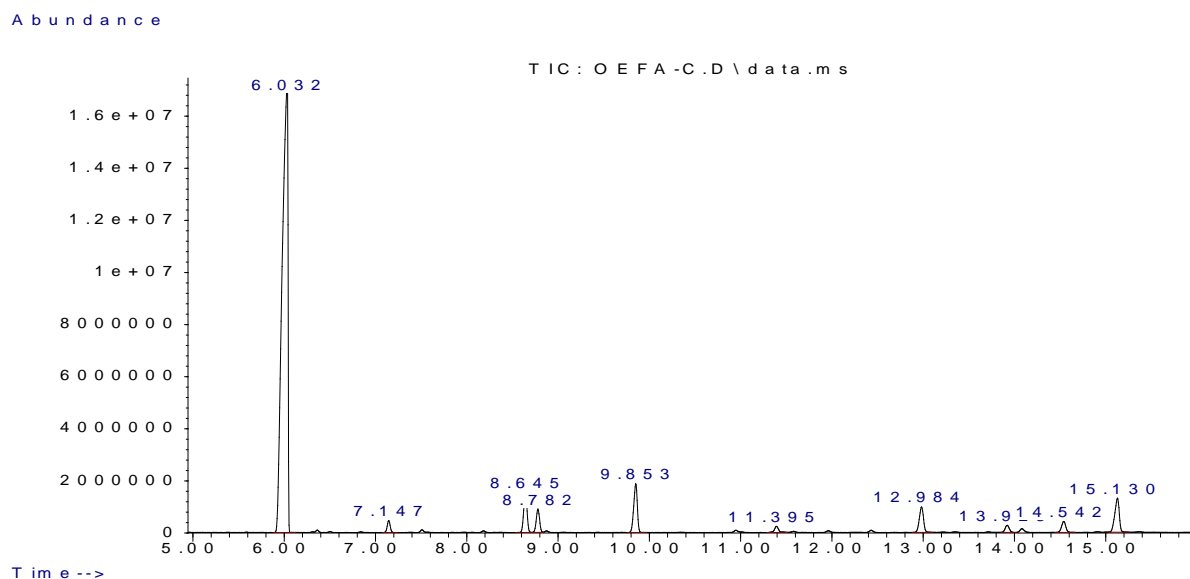


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE OUTONO

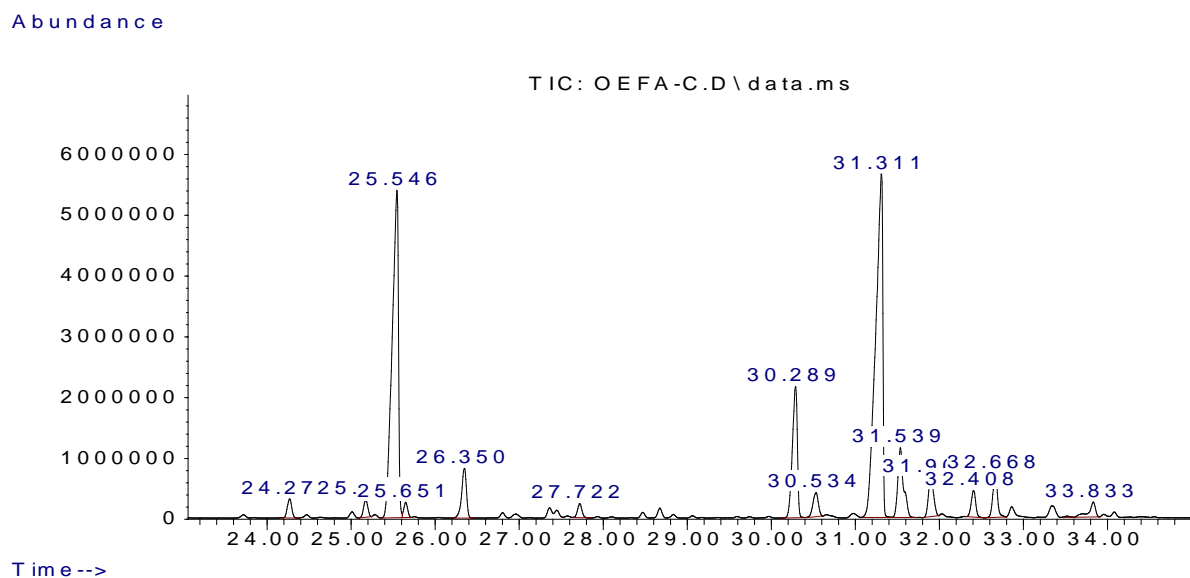


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (23-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE OUTONO

TABELA 03 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE INVERNO

Compostos	TR	IR	Área do pico (%)	Identificação
α -pineno	6,04	937	33,64	IR, EM
β -pineno	7,15	978	0,42	IR, EM
<i>p</i> -cimeno	8,66	1025	3,62	IR, EM
limoneno	8,79	1029	1,16	IR, EM
γ -terpineno	9,85	1058	1,30	IR, EM
linalol	11,40	1101	0,33	IR, EM
(<i>E</i>)-pinocarveol	13,02	1140	3,87	IR, EM
M = 150	13,93	1163	1,22	IR, EM
borneol	14,09	1166	0,55	IR, EM
terpinen-4-ol	14,54	1177	0,68	IR, EM
α -terpineol	15,15	1192	2,85	IR, EM
α -gurjuneno	24,27	1408	0,59	IR, EM
β -gurjuneno	25,18	1431	0,49	IR, EM
aromadendreno	25,56	1440	13,49	IR, EM
M = 204	25,66	1443	0,37	IR, EM
<i>allo</i> -aromadendreno	26,35	1460	1,45	IR, EM
γ -selineno	27,73	1494	0,60	IR, EM
M = 222	30,31	1560	4,99	IR, EM
maaliol	30,54	1566	1,07	IR, EM
globulol	31,36	1587	19,51	IR, EM
viridiflorol	31,56	1592	2,88	IR, EM
rosifoliol	31,92	1602	1,49	IR, EM
M = 218	32,42	1615	0,97	IR, EM
M = 222	32,68	1623	1,53	IR, EM
M = 220	32,87	1628	0,42	IR, EM
α -cadinol	33,84	1654	0,52	IR, EM
Compostos identificados				
Monoterpenos hidrocarbonetos			40,14	
Monoterpenos oxigenados			8,28	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			16,62	
Sesquiterpenos oxigenados			25,47	

NOTA: TR: tempo de retenção em minutos

IR: índice de retenção

EM: espectro de massas

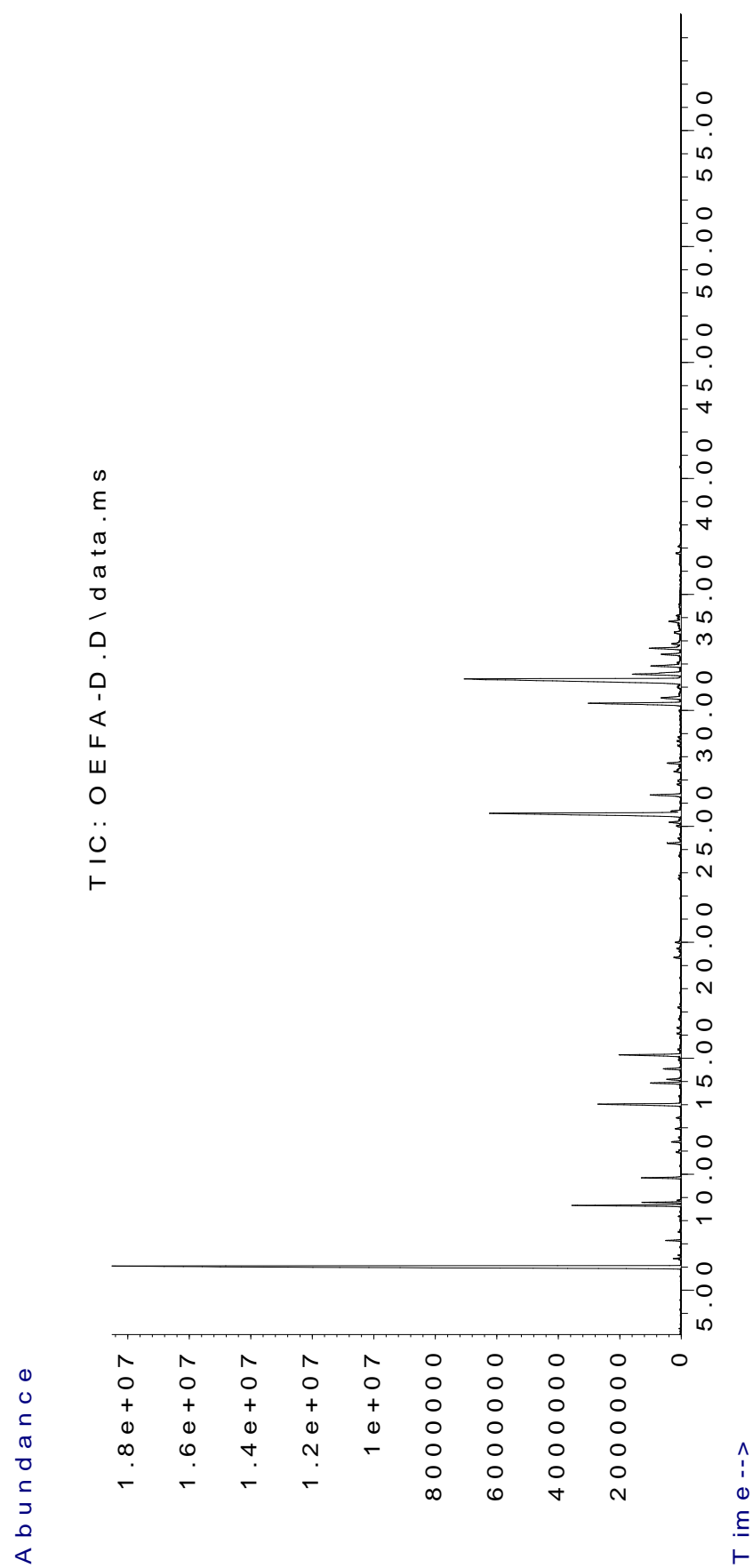


FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE INVERNO

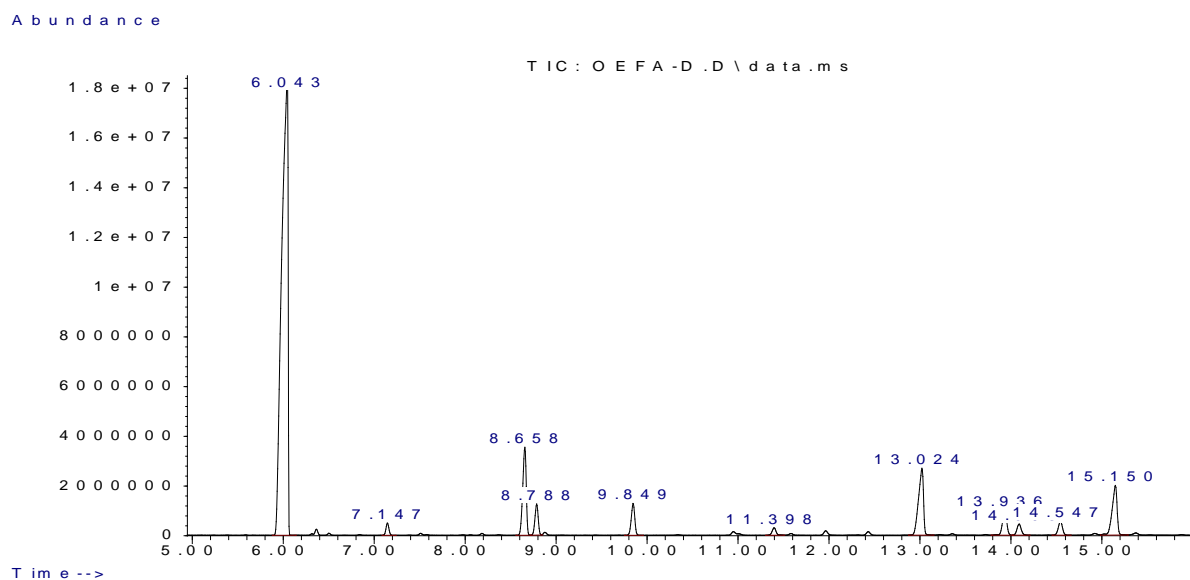


FIGURA 15 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE INVERNO

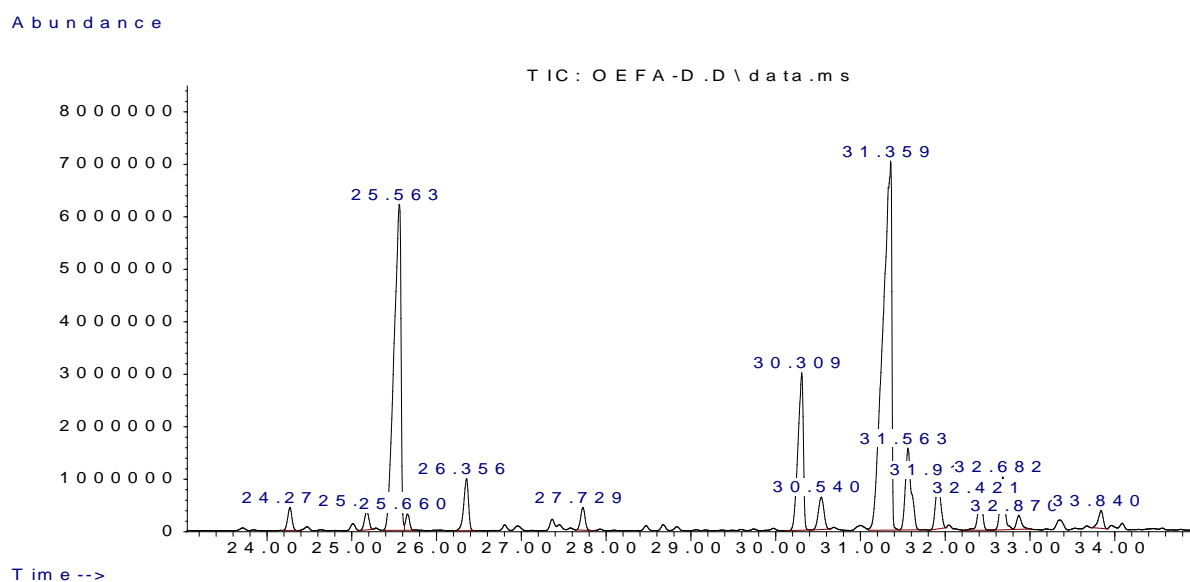


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (23-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE INVERNO

TABELA 04 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA

Compostos	TR	IR	Área do pico (%)	Identificação
α -pineno	6,04	937	31,56	IR, EM
β -pineno	7,15	978	0,48	IR, EM
<i>p</i> -cimeno	8,66	1025	2,91	IR, EM
limoneno	8,79	1029	1,07	IR, EM
γ -terpineno	9,84	1058	0,34	IR, EM
linalol	11,40	1101	0,42	IR, EM
(<i>E</i>)-pinocarveol	13,03	1141	4,43	IR, EM
M = 150	13,94	1163	1,49	IR, EM
borneol	14,09	1166	0,49	IR, EM
terpinen-4-ol	14,54	1177	0,32	IR, EM
α -terpineol	15,15	1192	3,03	IR, EM
α -gurjuneno	24,28	1409	1,42	IR, EM
β -gurjuneno	25,18	1431	0,52	IR, EM
aromadendreno	25,57	1440	13,94	IR, EM
M = 204	25,66	1443	0,40	IR, EM
<i>allo</i> -aromadendreno	26,36	1460	1,62	IR, EM
γ -selineno	27,74	1494	1,29	IR, EM
M = 222	30,31	1560	5,06	IR, EM
maaliol	30,54	1566	1,08	IR, EM
globulol	31,36	1587	20,37	IR, EM
viridiflorol	31,57	1593	3,16	IR, EM
rosifoliol	31,92	1602	1,58	IR, EM
M = 218	32,42	1615	0,80	IR, EM
M = 222	32,68	1623	1,58	IR, EM
α -cadinol	33,84	1654	0,68	IR, EM
Compostos identificados				
Monoterpenos hidrocarbonetos			36,36	
Monoterpenos oxigenados			8,69	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			18,79	
Sesquiterpenos oxigenados			26,87	

NOTA: TR: tempo de retenção em minutos

IR: índice de retenção

EM: espectro de massas

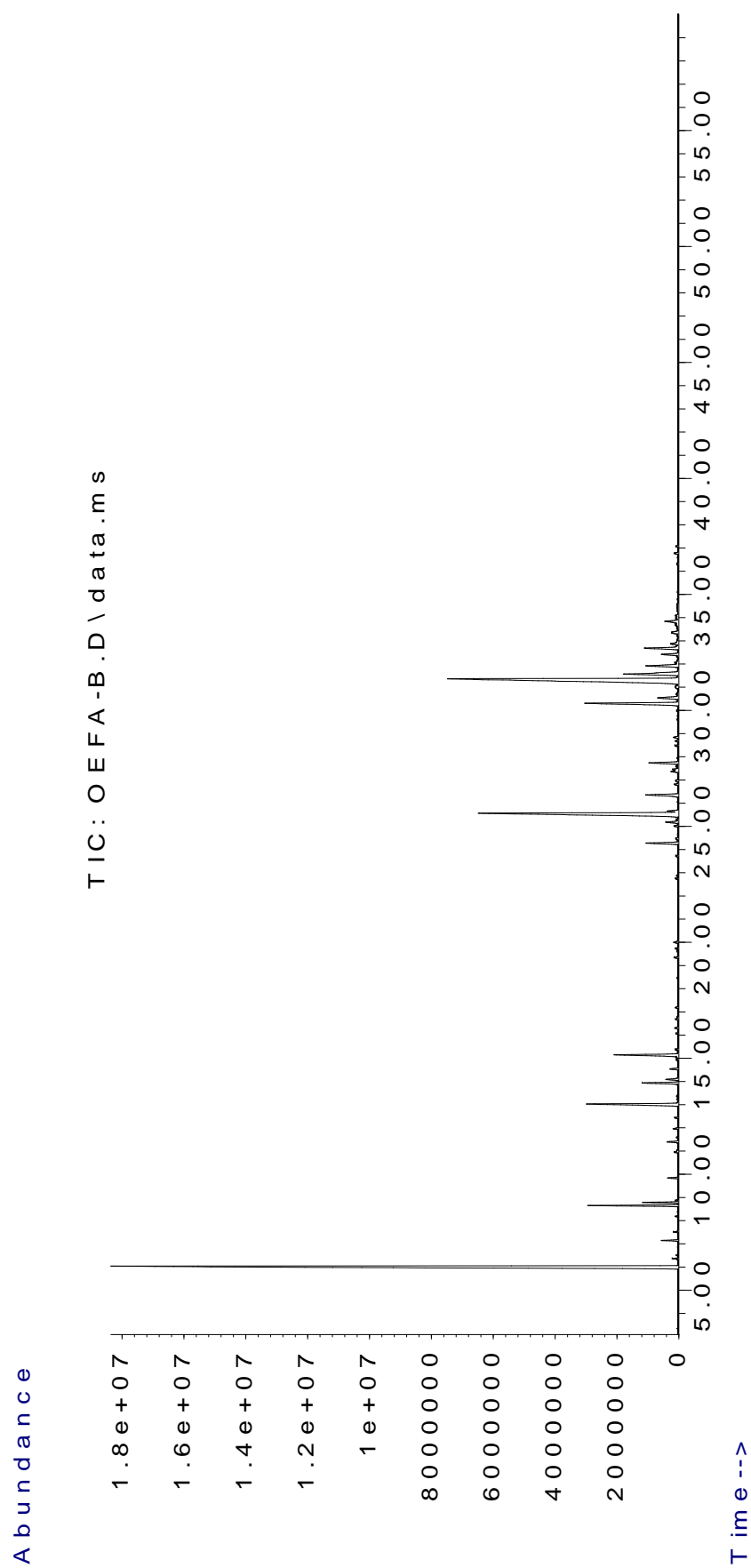


FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA

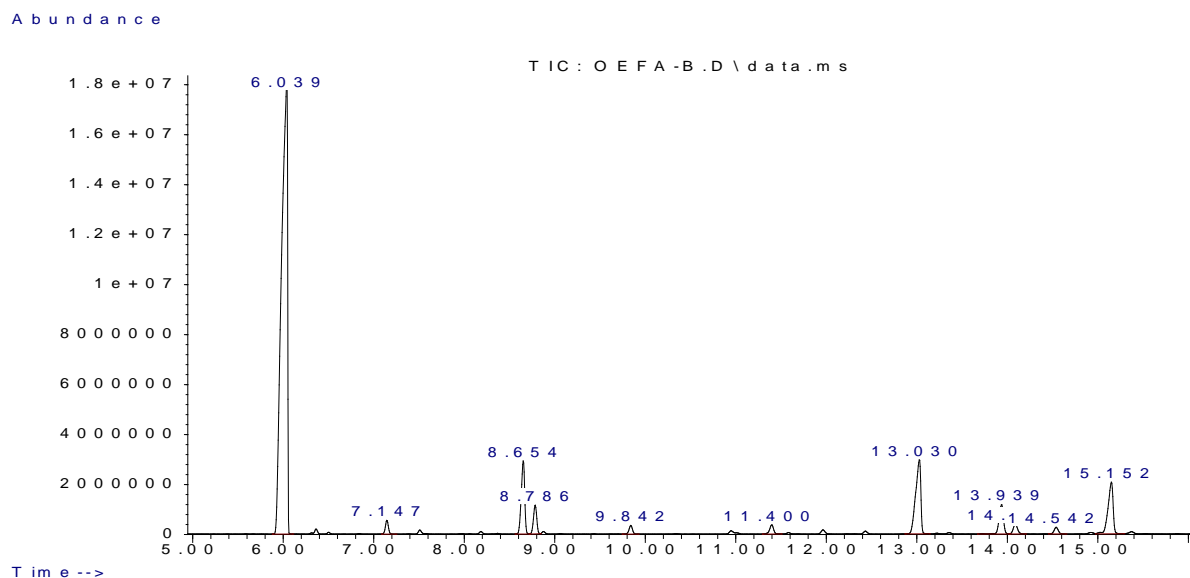


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA

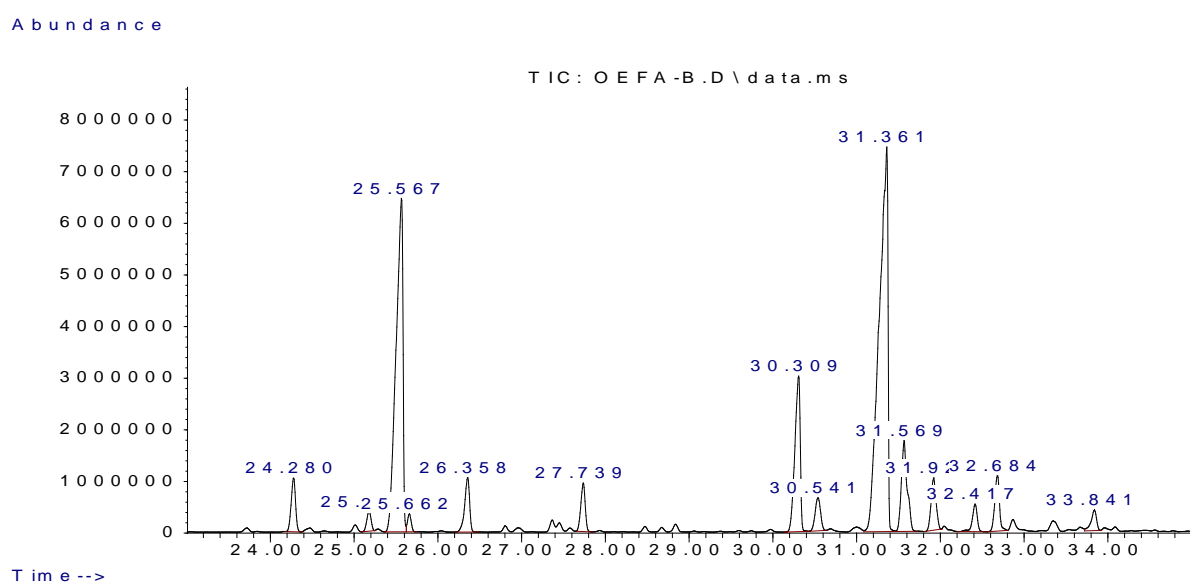


FIGURA 19 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (23-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA

Com o objetivo de elucidar as diferenças e semelhanças químicas entre as amostras, optou-se por um estudo estatístico utilizando PCA e HCA. Para realizar as análises multivariadas, os dados foram pré-processados por meio do autoescalamamento. No total, 29 compostos químicos foram analisados nas cinco amostras (TABELA 05).

TABELA 05 – CONSTITUINTES QUÍMICOS ANALISADOS POR PCA E HCA NAS AMOSTRAS OEFJ VERÃO, OEFA VERÃO, OEFA OUTONO, OEFA INVERNO E OEFA PRIMAVERA

Compostos		AMOSTRAS				
		OEFJ verão (2)	OEFA verão (1)	OEFA outono (3)	OEFA inverno (4)	OEFA primavera (5)
		Área do pico (%)				
1	α -pineno	36,82	36,92	38,63	33,64	31,56
2	β -pineno	0	0,48	0,55	0,42	0,48
3	<i>p</i> -cimeno	1,59	1,90	2,08	3,62	2,91
4	limoneno	0,81	0,90	1,18	1,16	1,07
5	γ -terpineno	5,51	4,38	2,72	1,30	0,34
6	M = 136	0	0,60	0	0	0
7	linalol	0	0	0,38	0,33	0,42
8	(<i>E</i>)-pinocarveol	0	0,84	1,62	3,87	4,43
9	M = 150	0	0	0,45	1,22	1,49
10	borneol	0	0	0	0,55	0,49
11	terpinen-4-ol	1,23	1,05	0,72	0,68	0,32
12	α -terpineol	1,32	2,02	2,34	2,85	3,03
13	α -gurjuneno	1,70	1,29	0,60	0,59	1,42
14	β -gurjuneno	0	0	0,53	0,49	0,52
15	aromadendreno	15,94	12,40	14,87	13,49	13,94
16	<i>allo</i> -aromadendreno	1,98	1,48	1,71	1,45	1,62
17	γ -selineno	0	0	0,45	0,60	1,29
18	viridifloreno	1,47	1,13	0	0	0
19	M = 222	4,98	4,97	4,71	4,99	5,06
20	M = 204	1,07	0,99	0,42	0,37	0,40
21	maaliol	0	0	0,93	1,07	1,08
22	globulol	20,54	20,22	17,73	19,51	20,37
23	viridiflorol	1,63	3,13	2,87	2,88	3,16
24	rosifoliol	1,63	1,60	1,47	1,49	1,58
25	M = 218	0	0,82	0,85	0,97	0,80
26	10- <i>epi</i> - γ - eudesmol	1,78	1,64	0	0	0
27	M = 222	0	0,98	1,45	1,53	1,58
28	M = 220	0	0	0	0,42	0
29	α -cadinol	0	0	0,76	0,52	0,68

NOTA: OEFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

Os teores dos constituintes dos óleos essenciais das cinco amostras foram inseridos no programa MATLAB para gerar os gráficos de *scores* e *loadings*. As amostras estão representadas no gráfico de *scores* (FIGURA 20) e os constituintes dos óleos essenciais estão representados como variáveis no gráfico de *loadings* (FIGURA 21).

O gráfico de *scores* revela similaridades e diferenças entre as amostras. Com a seleção de dois componentes principais (PC's), é revelada a similaridade das amostras de verão (OEFJ verão e OEFA verão) e a diferença da amostra do outono (OEFA outono) das demais (FIGURA 20).

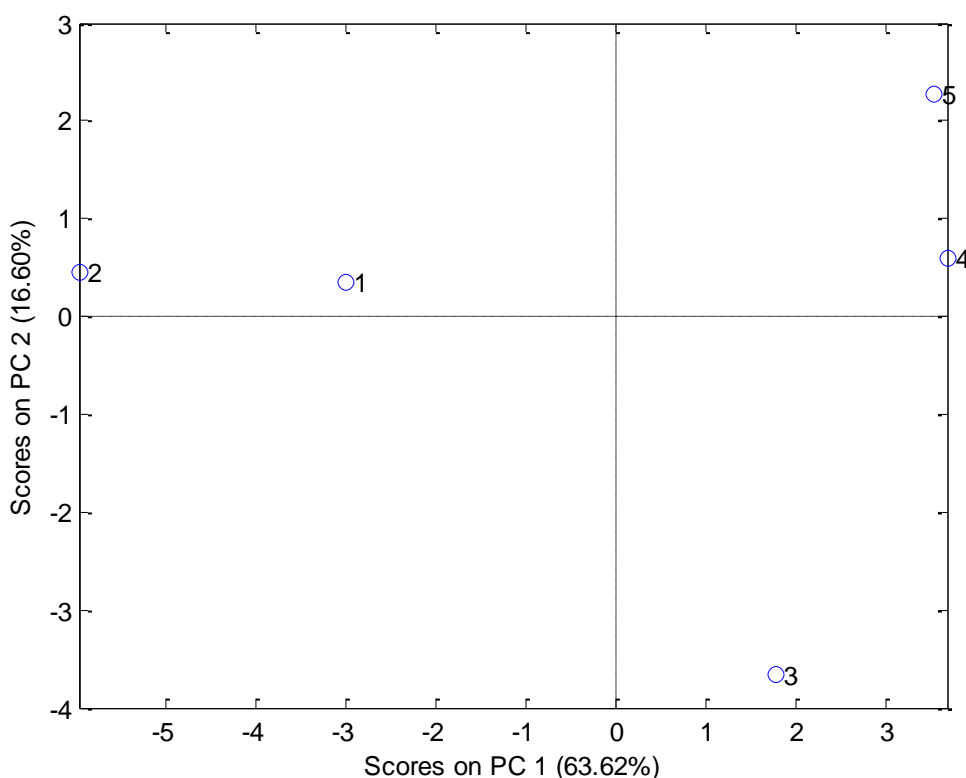


FIGURA 20 – GRÁFICO DE SCORES DAS AMOSTRAS OEFJ VERÃO (2), OEFA VERÃO (1), OEFA OUTONO (3), OEFA INVERNO (4) E OEFA PRIMAVERA (5) A PARTIR DA SELEÇÃO DE DOIS COMPONENTES PRINCIPAIS

PC1 diferencia as amostras OEFJ verão (2) e OEFA verão (1) das demais amostras porque estas são as únicas a apresentar valores negativos na PC1, revelando que essas amostras são semelhantes entre elas. E PC2 diferencia a amostra OEFA outono (3) das demais, a partir da apresentação de valores negativos na PC2, revelando uma composição diferenciada para essa amostra.

A partir da avaliação do gráfico de *loadings* (FIGURA 21) é possível prever que as amostras OEFJ verão e OEFA verão são diferentes das demais amostras devido à presença exclusiva ou em maior concentração dos compostos 10-*epi*- γ -eudesmol (26), M = 204 (20) e viridifloreno (18) nestas amostras. Outra característica de diferenciação poderia ser também a ausência ou menor concentração de alguns compostos nessas duas amostras: linalol (7), M=150 (9), α -terpineol (12), maaliol (21), (*E*)-pinocarveol (8), γ -selineno (17), M=222 (27), *p*-cimeno (3), β -gurjuneno (14), α -cadinol (29) e limoneno (4), os quais são vistos exatamente do lado oposto do gráfico. A diferenciação da amostra OEFA outono pode ser devido a maior concentração do monoterpene α -pineno (1) e menor concentração dos compostos M=222 (19) e globulol (22) apresentados no lado oposto do gráfico. Além disso, as duas amostras restantes, OEFA inverno e OEFA primavera apresentam similaridade em função da presença ou maior concentração dos compostos α -terpineol (12), M=150 (9), (*E*)-pinocarveol (8), *p*-cimeno (3), γ -selineno (17) e borneol (10).

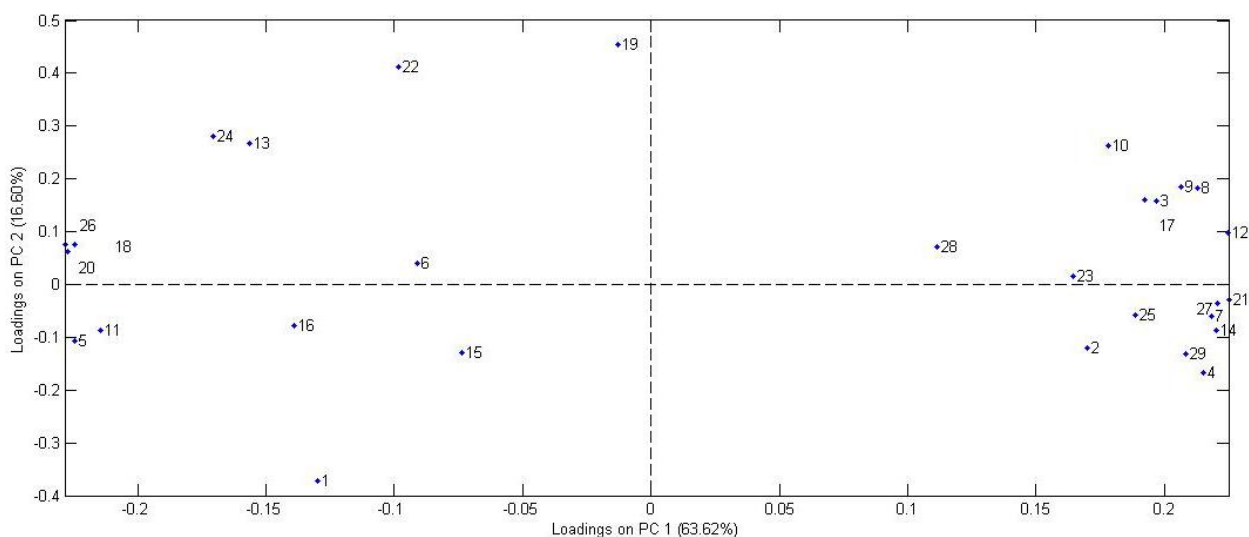


FIGURA 21 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DAS AMOSTRAS OEFJ VERÃO, OEFA VERÃO, OEFA OUTONO, OEFA INVERNO E OEFA PRIMAVERA A PARTIR DA SELEÇÃO DE DOIS COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise por HCA tem por objetivo formar grupos por similaridade. O primeiro grupo formado, representado pela menor distância euclidiana, foi 1-2. Estes são representados pelas amostras OEFA verão (1) OEFJ verão (2) e apresentam a maior similaridade. O segundo grupo formado é 4-5, representado pelas amostras OEFA inverno (4) e OEFA primavera (5). O último grupo formado está representado pela amostra 3 (OEFA outono), a qual apresenta a maior distância dos demais, o que representa menor semelhança com as outras amostras.

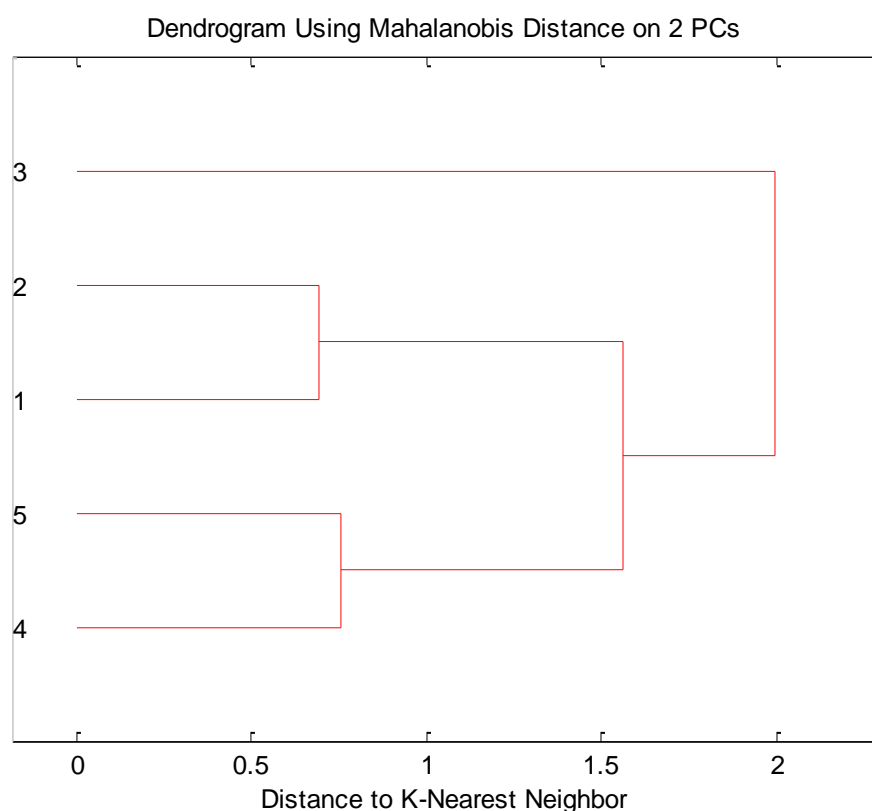


FIGURA 22 – ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS APLICADA ÀS AMOSTRAS OEFJ VERÃO (2), OEFA VERÃO (1), OEFA OUTONO (3), OEFA INVERNO (4) E OEFA PRIMAVERA (5)

Considerando as análises multivariadas realizadas, diversas variações na constituição química dos óleos essenciais da espécie em estudo foram observadas. Neste caso, essas alterações estão particularmente vinculadas à época da colheita. No entanto, variações na composição do óleo essencial obtido a partir de material foliar de mesma estação, porém de locais distintos, também podem ser observadas. Boscardin (2009) identificou o α -pineno (22,63%), seguido de γ -terpineno (16,55%), *p*-cimeno (10,60%), aromadendreno (9,94%) e terpinen-4-ol (5,88%) como constituintes majoritários do óleo volátil de *E. benthamii* extraído de folhas coletadas

no outono de 2008 em Colombo, Paraná. No entanto, no presente estudo, o óleo essencial das amostras foliares coletadas em Ponta Grossa e nessa mesma estação apresentou os compostos α -pineno (38,63%), globulol (17,73%), aromadendreno (14,87%), viridiflorol (2,87%) e γ -terpineno (2,72%) como predominantes. Da mesma forma, foram identificados no óleo volátil extraído a partir das folhas colhidas durante a primavera de 2008 em Colombo, os compostos α -pineno (20,84%), globulol (15,17%), *p*-cimeno (14,10%), γ -terpineno (11,01%), aromadendreno (8,78%) e terpinen-4-ol (4,21%) (BOSCARDIN, 2009). Enquanto que essa investigação apontou o monoterpene α -pineno (31,56%) seguido dos compostos globulol (20,37%), aromadendreno (13,94%), (*E*)-pinocarveol (4,43%) e viridiflorol (3,16%) como constituintes principais. Esses achados demonstram a necessidade de sempre estabelecer a composição química por CG/EM da amostra disponível, previamente à realização de estudos biológicos.

Silva, Brito e Silva Júnior (2006) investigaram o potencial de algumas espécies de eucalipto para obtenção de essência. Nesse trabalho, foi verificado um teor de 0,40% e 0,35% de óleo volátil de *E. benthamii* extraído de folhas frescas colhidas nos meses de outono e verão, respectivamente. Os principais componentes do óleo volátil dessa espécie foram determinados, sendo o α -pineno o constituinte majoritário. Concentrações de 47,6, 26,4, 24,2 e 34,7% de α -pineno foram identificadas no óleo essencial extraído a partir do material foliar colhido nos meses de outono, inverno, primavera e verão, respectivamente. Outro estudo envolvendo a subespécie *E. benthamii* var *benthamii* apontou 73,15% de α -pineno, 0,43% de *p*-cimeno e ausência de 1,8-cineol na constituição química do óleo essencial (LUCIA *et al.*, 2011). Mossi e colaboradores (2011) avaliaram a composição química dos óleos essenciais de *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. viminalis* e *E. saligna*. Os compostos α -pineno (54%), 1,8-cineol (9,9%), viridiflorol (17,1%) e aromadendreno (7,3%) foram identificados como majoritários para o óleo essencial de *E. benthamii* obtido a partir da extração de folhas colhidas no verão em Erechim, no Rio Grande do Sul. Tian *et al.* (2005) indicou os terpenos α -pineno (31%), globulol (15,34%), aromadendreno (13,80%) e *epi*-globulol (4,86%) como constituintes principais do óleo volátil de *E. benthamii* obtido a partir de amostras foliares coletadas na China.

Diferentemente do verificado para outras espécies de *Eucalyptus* (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2004; SILVESTRE *et al.*, 1997; BARTON; TJANDRA; NICHOLAS, 1989), o

1,8-cineol ou eucaliptol, componente predominante da espécie farmacopeica *E. globulus*, não foi identificado na composição química da espécie *E. benthamii*. No entanto, um teor relativamente alto de α -pineno foi verificado para as amostras de óleos essenciais extraídos a partir de folhas das quatro estações.

O monoterpene hidrocarboneto α -pineno, $C_{10}H_{16}$, constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*, tem sido relacionado à atividade antibacteriana (LEITE *et al.*, 2007) e inseticida, bem como ao uso industrial para a obtenção da cânfora e para a produção de perfumes (THE MERCK INDEX, 2001). Esse composto é um dos principais componentes da turpentina, uma oleorresina tóxica extraída de espécies de *Pinus* e tem sido verificado como um dos componentes predominantes de algumas espécies de *Eucalyptus*. Silva, Brito e Silva Júnior (2006) identificaram o α -pineno como constituinte majoritário para as espécies *E. benthamii* e *Eucalyptus cloeziana* F.Muell. Sartorelli *et al.* (2007) observaram que o óleo volátil das folhas de *E. robusta*, coletadas durante o outono, apresentou um alto teor de α -pineno (73%). Para o óleo essencial de *E. saligna*, comprovaram diferenças químicas relacionadas ao estágio fenológico das folhas, sendo que o monoterpene α -pineno foi quantificado somente no óleo volátil obtido a partir de folhas coletadas de árvores em floração, com teor de 45,1% (SARTORELLI *et al.*, 2007). Entretanto, Estanislau *et al.* (2001) evidenciaram 0,27% desse monoterpene no óleo essencial de *E. saligna*. Os representantes híbridos de *E. grandis* x *E. tereticormis* e *E. grandis* x *E. camaldulensis* revelaram concentrações de 22,8 e 30,65% de α -pineno em seus óleos essenciais, respectivamente (LUCIA *et al.*, 2008). Boscardin (2009) indicou a presença de 22,63% de α -pineno no óleo essencial obtido de folhas de *E. benthamii* coletadas no outono, e 20,84% na amostra de primavera.

O eucaliptol, 1,8-epoxi-*p*-mentano ou 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]-octano, também é conhecido como 1,8-cineol ou cajeputol. Esse composto apresenta a fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$ e é constituído por duas subunidades isoprênicas (THE MERCK INDEX, 2001). O eucaliptol é o componente majoritário de alguns óleos essenciais de *Eucalyptus*, além de ser obtido por meio de outras fontes. Segundo a *International Standard Organization* (ISO), os óleos voláteis do gênero *Eucalyptus* que são ricos em 1,8-cineol e recomendados para a indústria farmacêutica, devem apresentar entre 80-85% de eucaliptol em sua composição (VITTI; BRITO, 2003). Entre as atividades biológicas reconhecidas, o 1,8-cineol apresenta ação

expectorante, anestésica, antisséptica, antibacteriana, antifúngica, repelente, entre outras (SIMÕES; SPITZER, 2007).

O monoterpeno oxigenado 1,8-cineol foi identificado como o constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *E. camaldulensis*, a partir de espécimes coletados na região sudeste do Brasil, com variação de teor de 28 a 52,1% (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006). Porém, Cheng *et al.* (2009) verificaram 22,52% de α -pineno e 9,48% de 1,8-cineol nos óleos essenciais extraídos das folhas frescas de exemplares dessa mesma espécie localizados na região leste de Taiwan. Um teor de 19,13% de 1,8-cineol foi estabelecido para *E. camaldulensis* por Lucia e colaboradores (2008). Para a espécie *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake foi determinado teor de 58,34% de 1,8-cineol e 6,25% para o conteúdo de α -pineno (CHENG *et al.*, 2009). Em estudo com as folhas de *Eucalyptus dealbata* A. Cunn. ex Schauer, foi observado um teor de 70% para o 1,8-cineol para as amostras de inverno, enquanto o composto terpênico α -pineno foi quantificado em 16,3 e 23,5% para as amostras de outono e de verão, respectivamente (SEFIDKON; BAHMANZADEGAN; ASSAREH, 2008). Silva, Brito e Silva Júnior (2006), ao avaliarem o potencial de espécies de *Eucalyptus* para a produção de óleos essenciais, identificaram o 1,8-cineol como o constituinte principal de *E. viminalis* (85,6%), *E. globulus* (85,5%), *E. dunni* (67%), *Eucalyptus propinqua* H. Deane & Maiden (60,5%), *E. tereticormis* (54,8%), *E. camaldulensis* (40,8%) e *Eucalyptus maculata* Hook. (28,7%).

Barton, Tjandra e Nicholas (1989) determinaram, majoritariamente, compostos monoterpenoides a partir da análise de óleos voláteis extraídos do material foliar de *Eucalyptus kochii* Maiden et Blakely subsp. *kochii*, *E. kochii* subsp. *plenissima* e *Eucalyptus oleosa* var. *borealis* C. A. Gardner, sendo que o teor de 1,8-cineol variou entre 80 e 90% nas três espécies estudadas. Para o óleo essencial das folhas de *Eucalyptus microcorys* F. Muller, Almeida e colaboradores (2005) identificaram o monoterpenoide 1,8-cineol, com teor de 87%, como constituinte principal.

No óleo essencial de *E. globulus* subsp. *globulus*, obtido a partir de espécimes de Portugal, foi observado maior conteúdo de 1,8-cineol (de 62,5 a 71%) para as folhas adultas em relação às folhas jovens (de 48 a 62,5%) (SILVESTRE *et al.*, 1997). Yang e colaboradores (2004) identificaram 90% de 1,8-cineol e 2,2% de α -pineno no óleo essencial das folhas de *E. globulus*. Malinowski (2010) quantificou

65,34% de 1,8-cineol na composição do óleo essencial obtido a partir de folhas secas de *E. globulus* spp. *bicostata*, coletadas no outono.

Franco e colaboradores (2005) identificaram os compostos 1,8-cineol (75,70%), α -terpineol (9,67%), *o*-cimeno (8,42%) e α -pineno (6,21%) como componentes majoritários do óleo volátil das folhas de *E. cinerea*. Babu e Singh (2009) encontraram maiores teores de 1,8-cineol no óleo essencial de *E. cinerea* obtido a partir das folhas frescas (84,4%) em relação às folhas dessecadas por 24 h (77,6%).

Antônio (2011) identificou o 1,8-cineol (81,17%) como componente majoritário do óleo essencial de folhas secas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, seguido dos compostos α -pineno (8,36%), limoneno (5,61%) e α -terpineol (2,02). Mantero *et al.* (2007) estabeleceram um teor de 85,95% de 1,8-cineol a partir do óleo essencial de folhas secas de *E. badjensis*.

Lucia e colaboradores (2008), ao estudarem o rendimento, a composição química e a bioatividade de óleos essenciais obtidos de folhas de 12 espécies de *Eucalyptus*, verificaram menores teores de 1,8-cineol para *Eucalyptus gunnii* Hook (17,95%), *E. tereticormis* (18,59%) e *E. camaldulensis* (19,13%).

Entretanto, alguns trabalhos têm relatado a ausência do 1,8-cineol na constituição química de óleos essenciais de *Eucalyptus*. Giles e colaboradores (2010) investigaram a composição química dos óleos essenciais obtidos a partir de folhas das espécies *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey, *Eucalyptus dives* Schauer e *Eucalyptus olida* L.A.S. Johnson & K.D. Hill coletadas na Austrália. Apenas para a espécie *E. staigeriana* foi identificado o 1,8-cineol (34,8%) na constituição do óleo essencial. Os compostos piperitona (40,5%), α -felandreno (17,4%), *p*-cimeno (8,5%) e terpinen-4-ol (4,7%) foram identificados como componentes predominantes do óleo essencial de *E. dives*. Em contraste, apenas um componente majoritário, o (*E*)-metil cinamato, representou 99% da composição do óleo volátil de *E. olida*. Elaissi *et al.* (2011) avaliaram os óleos essenciais de 20 espécies de *Eucalyptus* colhidas no Noroeste e Norte da Tunísia. De um total de 20 espécies, sete *taxa* continham menos de 5% de 1,8-cineol. Sartorelli *et al.* (2007) relataram a ausência de 1,8-cineol nas composições químicas dos óleos essenciais de *E. saligna* e *E. robusta*.

As variações verificadas na constituição química dos óleos voláteis extraídos a partir de folhas de representantes do gênero *Eucalyptus* podem estar relacionadas

a fatores geográficos, edáficos e climáticos, bem como ao procedimento e às condições extrativas. Além disso, essas variações também podem ocorrer em função da idade das árvores bem como de suas folhas (SIMÕES; SPITZER, 2007; HE; MURRAY; LYONS, 2000).

Os resultados relativos a constituição química do óleo essencial em estudo são condizentes com o verificado para algumas espécies de *Eucalyptus*, no qual o 1,8-cineol está ausente ou é identificado em quantidades vestigiais. Porém, são pouquíssimos taxa desse gênero que apresentam tal particularidade química na composição de sua essência. Dessa forma, a partir da análise dos dados indicados na literatura, é possível sugerir que *E. benthamii* apresenta um óleo essencial com composição química diferenciada, visto que não contém 1,8-cineol ou apresenta somente traços deste componente monoterpênico e uma concentração relativamente elevada de α -pineno.

5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

5.2.1 Efeito do óleo essencial de *E. benthamii* e do α -pineno sobre o edema de orelha e migração celular induzidos por TPA

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial obtido a partir das folhas adultas de *E. benthamii* e do monoterpeneo α -pineno foi avaliada por meio do modelo de edema de orelha e migração celular em camundongos. O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica do agente flogístico TPA (2,5 μ g/orelha). Seis horas após a aplicação do TPA, os animais exibiram edema, representado pelo aumento significativo na espessura da orelha. O edema de orelha foi inibido pelo tratamento tópico com o óleo essencial de *E. benthamii* bem como pelo monoterpeneo α -pineno. Os resultados apresentados na Figura 23 mostram que o óleo essencial foi capaz de inibir a formação do edema induzido por TPA com uma inibição máxima de $51 \pm 6\%$ na dose de 0,1 mg/orelha. Entretanto, essa resposta inibitória do óleo essencial não apresentou um padrão dependente da dose administrada. O α -pineno apresentou atividade antiedematogênica com inibição máxima de $55 \pm 4\%$ para a dose de 1,0 mg/orelha e também um padrão independente da dose administrada (FIGURA 24). A

dexametasona (0,05 mg/orelha), usada como controle positivo, causou uma redução significativa do edema.

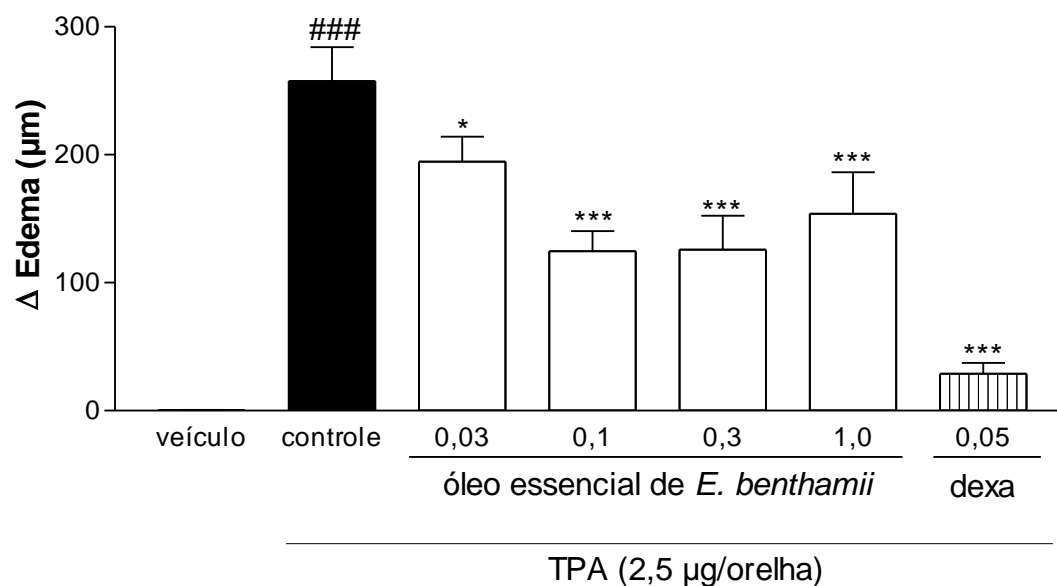


FIGURA 23 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS TOPICAMENTE COM O TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU APENAS A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO). NA SEQUÊNCIA, OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL (0,03 A 1 mg/ORELHA) E DEXAMETASONA (DEXA, 0,05 mg/ORELHA). AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM (N=5-8) DO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA EM MICRÔMETROS. ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE NEWMAN-KEULS. ### P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. * P<0,05 E *** P<0,001 QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

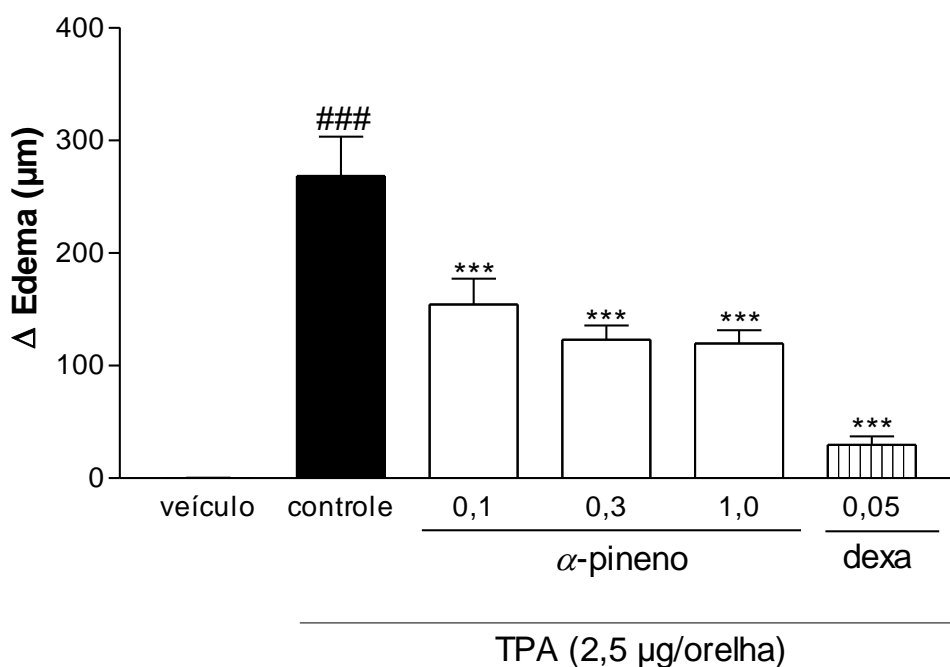


FIGURA 24 – EFEITO DO α -PINENO NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS TOPICAMENTE COM O TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU APENAS A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO). NA SEQUÊNCIA, OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM O α -PINENO (0,1 A 1 mg/ORELHA) E DEXAMETASONA (DEXA, 0,05 mg/ORELHA). AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM (N= 5-8) DO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA EM MICRÔMETROS. ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE POST-HOC DE NEWMAN-KEULS. ### P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

Posteriormente, foi avaliada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que é um marcador enzimático da infiltração de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado, a qual atinge o pico em 24 h após a aplicação do TPA e, então, decresce lentamente (LLORET; MORENO, 1995). Foram testadas as mesmas doses da curva dose-resposta do modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. A administração tópica de TPA aumentou expressivamente a atividade da enzima MPO. A atividade enzimática foi significativamente reduzida nos animais tratados com o óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e com o α -pineno. O óleo essencial diminuiu a atividade da MPO em $50 \pm 11\%$ (0,1 mg/orelha) (FIGURA 25). Enquanto que o α -pineno reduziu a atividade da MPO em $60 \pm 6\%$ (1,0 mg/orelha) (FIGURA 26). Da mesma forma que na redução do edema de orelha, a resposta inibitória do óleo essencial e do α -pineno não apresentou um padrão dependente da dose administrada. Nesse ensaio, a dexametasona também foi utilizada como controle positivo.

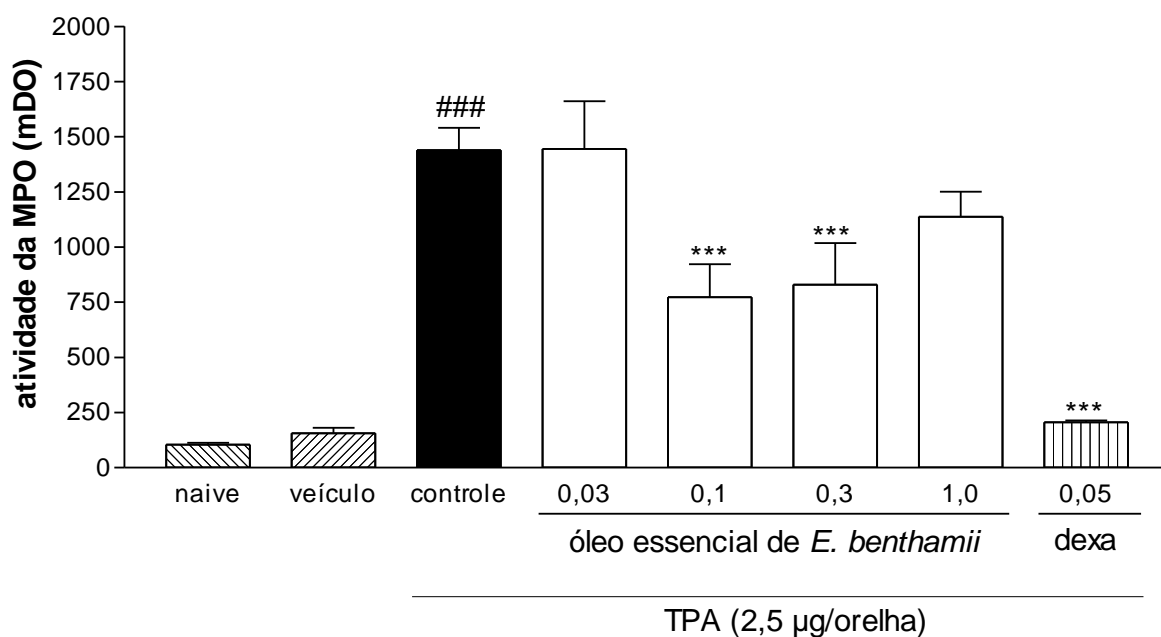


FIGURA 25 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MPO NO SOBRENADANTE DE HOMOGENATOS DE ORELHAS SUBMETIDAS AO TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS COM TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO, QUE RECEBEU A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO), E DO GRUPO NAIVE. AS DOSES ESTÃO EM mg/ORELHA. A ATIVIDADE DA MPO FOI AVALIADA 24 H APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO TPA. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA FOI QUANTIFICADA POR MEIO DE LEITOR DE PLACA ($\lambda=620$ nm). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM. (N= 5-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE NEWMAN-KEULS. ### $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

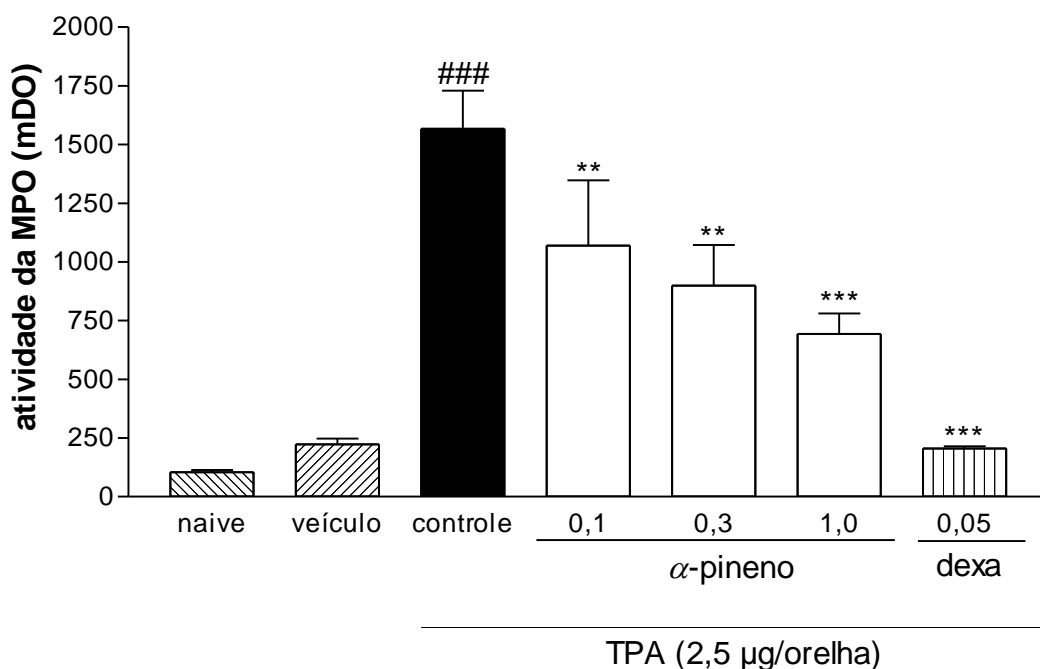


FIGURA 26 – EFEITO DO α -PINENO E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MPO NO SOBRENADANTE DE HOMOGENATOS DE ORELHAS SUBMETIDAS AO TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS COM TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO), E DO GRUPO NAIVE. AS DOSES ESTÃO EM mg/ORELHA. A ATIVIDADE DA MPO FOI AVALIADA 24 H APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO TPA. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA FOI QUANTIFICADA POR MEIO DE LEITOR DE PLACA ($\lambda=620$ nm). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM (N= 5-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE NEWMAN-KEULS. ### P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. ** P<0,01 E *** P<0,001 QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

O edema também foi avaliado por meio da análise histológica das orelhas dos camundongos. A análise por microscopia óptica, 24 h após a indução da inflamação com TPA, revelou aumento na espessura da orelha com clara formação de edema (FIGURA 27 – C). O edema foi reduzido com a administração tópica de 0,1 mg/orelha do óleo essencial de *E. benthamii* e 1,0 mg/orelha de α -pineno (FIGURA 27 – D e E), bem como por 0,05 mg/orelha de glicocorticoide dexametasona (FIGURA 27 – F). O grupo que recebeu apenas veículo não mostrou nenhuma mudança, mantendo-se intacto, assim como o naive (FIGURA 27 – A e B).

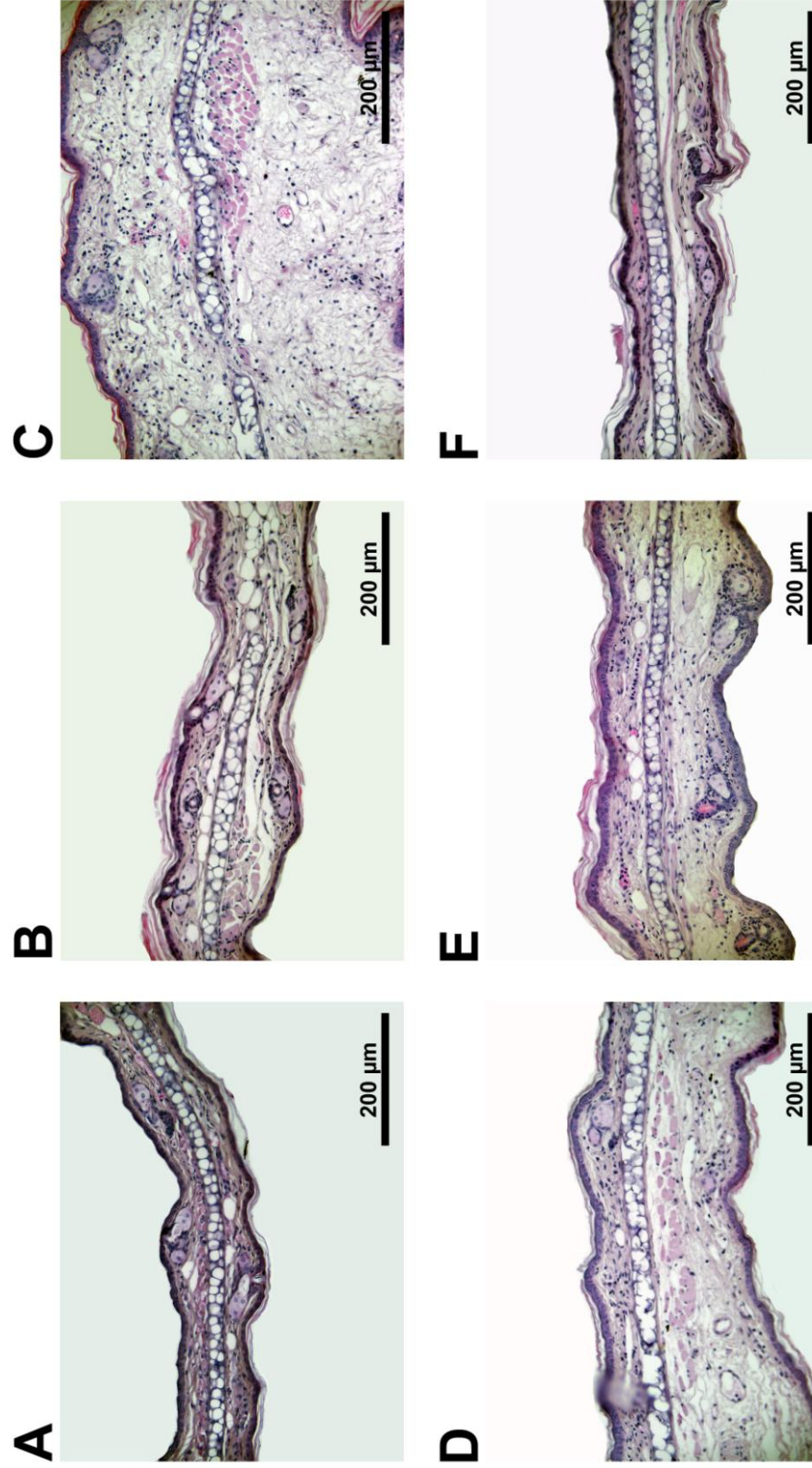


FIGURA 27 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* E DO α -PINENO SOBRE O EDEMA NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA. FOTOS REPRESENTATIVAS DE CORTES TRANSVERSAIS DE ORELHAS DE CAMUNDONGOS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA (AUMENTO DE 200X, ESCALA DE 200 μ m) COLETADAS APÓS A APLICAÇÃO DO TPA. (A) NAIVE, (B) VEÍCULO, (C) CONTROLE (TPA), (D) ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* (0,1 mg/ORELHA), (E) α -PINENO (1,0 mg/orelha) E (F) DEXAMETASONA (0,05 mg/ORELHA).

A avaliação da atividade anti-inflamatória de fármacos pode ser realizada por diversos modelos experimentais inflamatórios. Os modelos experimentais permitem identificar compostos com ação anti-inflamatória, os quais poderão ser empregados no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, tendo em vista que tais modelos promovem condições semelhantes às observadas em alguns tipos de dermatites (BOUCLIER *et al.*, 1990). Nesta investigação, o óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e seu constituinte majoritário, o α -pineno, foram estudados quanto a um possível efeito anti-inflamatório por meio do modelo experimental de inflamação aguda induzida pelo TPA. O controle positivo empregado nestes ensaios foi a dexametasona, um glicocorticoide reconhecido por sua potente atividade anti-inflamatória.

O agente irritante TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) é um composto presente no óleo de cróton (*Croton tiglium* L.). É um potente agente flogístico e promotor de tumor capaz de desencadear uma resposta inflamatória e hiperproliferativa muito intensa, semelhante a algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2003; GÁBOR, 2000). A resposta inflamatória cutânea, provocada pela aplicação tópica de TPA, é caracterizada por vasodilatação e desenvolvimento de eritema nas primeiras duas horas, acompanhado do aumento da espessura da orelha como consequência do extravasamento celular, que alcança um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 h. Entre a quarta e sexta hora, é possível constatar a aderência dos leucócitos polimorfonucleares na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos. Contudo, a infiltração máxima de leucócitos no tecido é atingida somente 24 h após a administração tópica do TPA (YOUNG *et al.*, 1983).

O TPA exerce sua ação por meio da ativação da proteína quinase C (PKC), bem com da ativação da via MAP quinase (MAPK), fosfolipase A2 (PLA2), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que culmina na síntese e liberação de múltiplos mediadores pró-inflamatórios, aos quais se atribui o desenvolvimento do edema, migração leucocitária e hiperproliferação celular (MURAKAWA *et al.*, 2006; DE BERNARDIS *et al.*, 1994). A ativação da MAPK pela PKC causa a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como NF- κ B e a AP-1. Tais fatores de transcrição nuclear têm uma função central na regulação de várias proteínas pró-inflamatórias, como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS)

(PASCUAL; GLASS, 2006; GLASS; OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES *et al.*, 2001). Por outro lado, a fosforilação da PLA2 pela PKC resulta na liberação de ácido araquidônico (AA), seguida da produção de prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT) via COX e LOX, respectivamente (WANG *et al.*, 2000).

Outros parâmetros inflamatórios envolvidos em diversas doenças cutâneas também podem ser avaliados por meio do modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. Um exemplo é a infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda (WINYARD, 2003; GÁBOR, 2000). Os neutrófilos são as primeiras células a se deslocarem para a região exposta a um estímulo nocivo. Na região de inflamação, os neutrófilos liberam várias substâncias, tais como ROS, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, como a MPO, colaborando na manutenção do processo inflamatório (BRADLEY *et al.*, 1982). A MPO, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion cloro, em concentrações fisiológicas, para produzir ácido hipocloroso (HClO), o qual é um potente oxidante citotóxico relacionado ao dano tecidual provocado pelos neutrófilos na inflamação bem como a uma ação antimicrobiana (ROMAN, 2006). Dessa forma, a enzima MPO é um importante marcador da presença de leucócitos polimorfonucleares na região de inflamação, visto que a avaliação de sua atividade está diretamente relacionada à quantidade de células infiltradas no tecido inflamado. (BRADLEY *et al.* 1982). Postula-se que a inibição da atividade da MPO quando da administração de um composto pode estar relacionada à inibição direta desta enzima, a diminuição de neutrófilos no tecido inflamado, ou ainda a redução da disponibilidade de seu substrato (H_2O_2) (ARNHOLD, 2003).

A atividade anti-inflamatória de óleos essenciais tem sido amplamente pesquisada (SÜNTAR *et al.*, 2011; OCAÑA-FUENTES *et al.*, 2010; MIGUEL, 2010; HAJHASHEMI; SAJJADI; HESHMATI, 2009; JUHÁS *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2007; ESTEVES *et al.*, 2005; CHAO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2003). O efeito anti-inflamatório atribuído a algumas essências parece estar relacionado não só à atividade antioxidante, mas também às interações com a cascata de sinalização envolvendo citocinas e fatores reguladores da transcrição e expressão de genes pró-inflamatórios (MIGUEL, 2010).

Pesquisadores verificaram que os óleos essenciais de *Aloe barbadensis* Miller, *Illicium verum* Hook f., *Citrus aurantium* subsp. *bergamia* (Risso) Wight & Arn., *Cinnamomum zeylanicum* Blume., *E. globulus*, *Juniperus communis* L., *Lavandula*

officinalis Chaix & Kitt, *Thymus vulgaris* L. e *Cananga odorata* (Lam.) Hook. F et Thomson, nos quais os compostos predominantes são limoneno, acetato de linalil, β -trans-cariofileno, 1,8-cineol, *p*-cimeno, timol e eugenol, mostraram fortes efeitos inibidores da lipoxigenase (WEI; SHIBAMOTO, 2010). Outros exemplos de inibidores da 5-lipoxigenase incluem alguns óleos essenciais extraídos a partir de exemplares do gênero *Salvia* L. oriundos da África do Sul, sendo que os autores atribuíram tais atividades a presença de 1,8-cineol, α -pineno e β -cariofileno no óleo essencial (KAMATOU *et al.*, 2006).

Silva *et al.* (2003) demonstraram os efeitos anti-inflamatórios dos óleos essenciais das espécies *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson, *E. tereticornis* e *E. globulus* por meio da inibição do edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrano, pela redução da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos induzida pela carragenina, e pela diminuição na permeabilidade vascular induzida por carragenina ou histamina. No entanto, resultados consistentes não foram observados para alguns dos parâmetros avaliados, tanto em termos de atividades quanto em relação à dose-resposta, o que pode estar relacionado à natureza rica e complexa dos óleos essenciais.

Medeiros *et al.* (2007) avaliaram os efeitos de um medicamento popularmente usado no estado da Paraíba, desde 1889 como antisséptico e anti-inflamatório. O medicamento fitoterápico brasileiro (BPF) é composto de corantes das plantas *E. globulus*, *Peltodon radicans* Pohl e *Schinus terebinthifolius* Raddi em etanol a 13,3° GL. Esse composto inibiu tanto o edema de orelha induzido por TPA como por capsaicina. Nas investigações utilizando a técnica de edema de pata induzido por carragenina, foi demonstrado que a administração oral também inibiu o edema de pata em aproximadamente 29%.

Alguns pesquisadores têm relatado que monoterpenos de óleos de *Eucalyptus* são potentes inibidores de mediadores inflamatórios. O eucaliptol inibe a síntese do fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β , leucotrieno B₄, e tromboxano B₂ (JUERGENS *et al.*, 1998a). Além disso, há dados indicando que o eucaliptol promove a inibição do metabolismo do ácido araquidônico em monócitos humanos (JUERGENS *et al.*, 1998b).

Martin *et al.* (1993) demonstrou a ação anti-inflamatória do monoterpeno hidrocarboneto α -pineno no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina ou PGE₁. Em outro estudo conduzido por Zhou *et al.* (2004), foi

demonstrado que o α -pineno inibiu, de maneira dose-dependente, a translocação nuclear de NF- κ B em células THP-1 induzidas pelo LPS. Esse efeito é particularmente devido a uma regulação positiva ou crescente da expressão de I κ B α . Os efeitos de TLCK (N-tosil-L-lisina clorometil cetona) no NF- κ B e no I κ B α em células THP-1, induzidas pelo LPS, foram similares aos provocados pelo α -pineno. TLCK é um inibidor de serino-protease, que antagoniza indiretamente a translocação nuclear de NF- κ B pelo bloqueio do caminho de sinalização para a fosforilação estímulo-induzida de I κ B α prevenindo sua degradação. Esses dados indicam que a estabilização previne a degradação do I κ B α e a translocação nuclear de NF- κ B, bloqueando potencialmente os efeitos do gene regulador do NF- κ B, o qual pode representar um dos mecanismos de ação anti-inflamatórios do α -pineno.

No que tange às suas propriedades biológicas, deve-se observar que os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas. Na literatura, na maioria dos casos, apenas os principais constituintes de certos óleos essenciais foram analisados. E, geralmente, os principais componentes refletem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais a partir do qual foram isolados (IPEK *et al.*, 2005). No entanto, é possível que a atividade dos principais compostos seja modulada por outras moléculas presentes em menores concentrações (FRANZIOS *et al.*, 1997; SANTANA-RIOS *et al.*, 2007; HOET *et al.*, 2006). Além disso, é provável que vários componentes dos óleos essenciais desempenhem um papel na penetração celular (CAL, 2006), na atração lipofílica/hidrofílica e na fixação nas paredes celulares e membranas, além da distribuição celular. Dessa forma, o conceito de sinergia parece exercer um papel bastante significativo na determinação de atividades biológicas a partir de óleos essenciais.

No delineamento gráfico, a relação entre a diminuição do edema e as doses do óleo essencial toma a forma de uma curva em “U”, no entanto a mesma redução do edema provocado pelas doses em estudo é observada para as doses do α -pineno. Um padrão de resposta similar ocorre quando da avaliação da atividade da enzima MPO, no qual é possível verificar a formação da mesma curva em “U” para o delineamento gráfico do óleo essencial. Porém, para as doses de 0,03 e 1,0 mg/orelha não há redução significativa da atividade da enzima. O α -pineno promoveu decréscimo na atividade da MPO nas três doses analisadas, porém essa resposta não foi dose-dependente.

Esses dados concordam com o proposto na literatura, visto que o α -pineno reflete a atividade anti-inflamatória do óleo essencial, porém a influência dos demais constituintes presentes na essência modula a atividade do composto majoritário, α -pineno, determinando resultados diferentes para a mesma avaliação biológica.

Em síntese, o óleo volátil em estudo, com sua constituição complexa de numerosas moléculas, possui efeito anti-inflamatório. Essa característica, somada à expansão gradual da área de cultivo dessa árvore pode determinar às folhas uma fonte paralela de recursos econômicos, em virtude da presença de metabólitos farmacologicamente ativos e promissores para o desenvolvimento de alternativas aos anti-inflamatórios em uso atualmente.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* E DO α -PINENO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA EX VIVO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO

Considerando-se que o óxido nítrico (NO) produzido em quantidades elevadas por células inflamatórias ativadas tem demonstrado estar envolvido na patogênese da inflamação, foi avaliada a influência do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* e do α -pineno sobre a produção de NO. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram estimulados com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS por 24 h concomitantemente aos tratamentos com três diferentes concentrações (5, 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de óleo essencial de folhas adultas e α -pineno. A utilização do LPS promove aumento da produção de NO pela indução da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS).

A Figura 28 apresenta os efeitos do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* sobre a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que o óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii* reduz significativamente a produção de NO em relação ao controle ($P < 0,001$). Na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o óleo essencial foi capaz de inibir a produção do NO em cerca de 25% com uma produção máxima de $75,64 \pm 9,87\%$ quando comparado ao grupo controle. Na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a produção de NO foi de $82,22 \pm 6,10\%$. Cumpre ressaltar que nas concentrações

testadas, não foi observado nenhum efeito citotóxico, como pode ser constatado pelos ensaios que avaliaram o efeito do óleo essencial sobre a viabilidade celular na Figura 29.

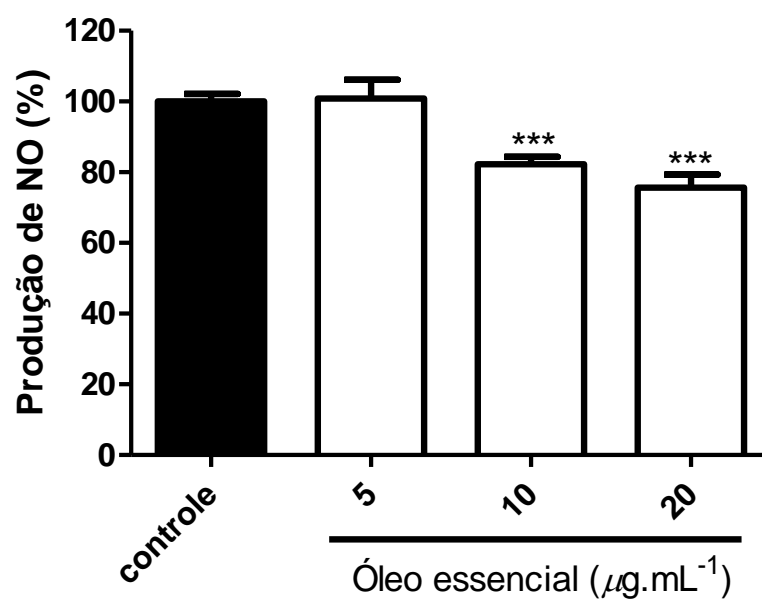


FIGURA 28 – PORCENTAGEM DE PRODUÇÃO DE NO, INDUZIDA POR LPS, DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii*. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE POST-HOC DE NEWMAN-KEULS. *** P<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

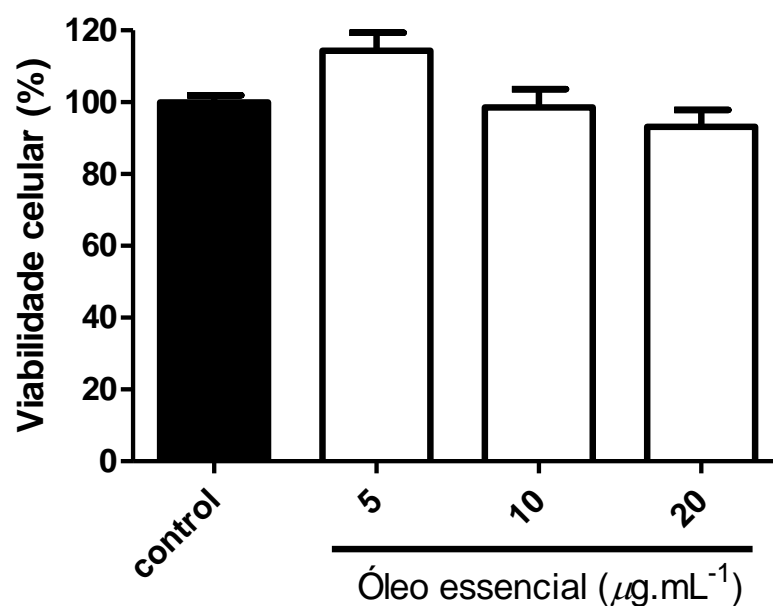


FIGURA 29 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS. A EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO TERPENOS OCORREU DURANTE 24 H E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DO MTT. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY.

A Figura 30 indica os efeitos do α -pineno sobre a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. Não foi evidenciada inibição na produção de NO a partir do monoterpeneo α -pineno, nas concentrações testadas. Similarmente ao óleo essencial, o α -pineno, também não exerceu ação citotóxica sobre os macrófagos peritoneais em estudo (FIGURA 31).

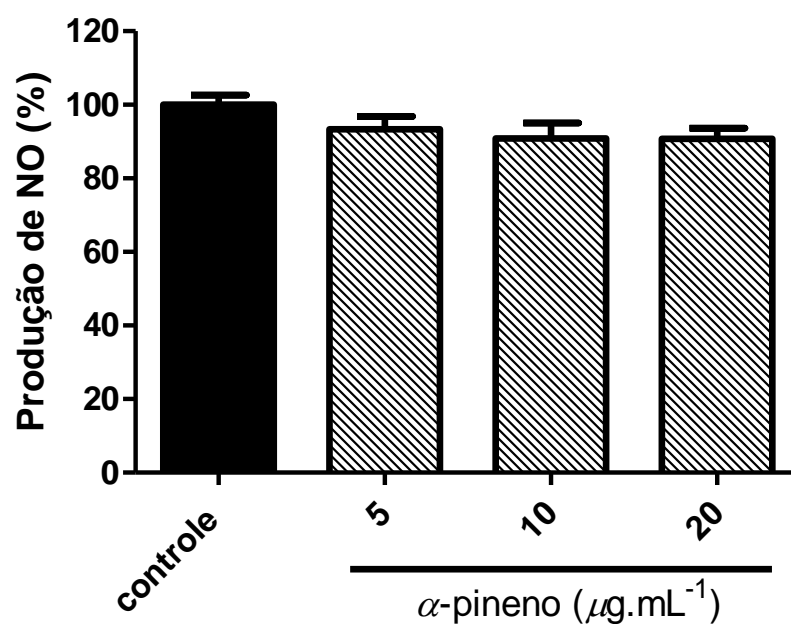


FIGURA 30 – PORCENTAGEM DE PRODUÇÃO DE NO, INDUZIDA POR LPS, DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM α -PINENO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY.

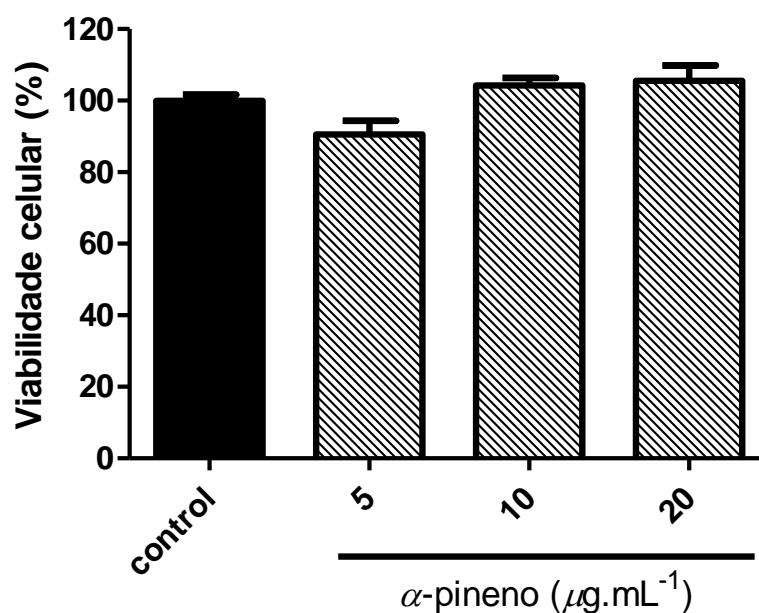


FIGURA 31 – EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS. A EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO TERPENO OCORREU DURANTE 24 H E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DO MTT. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY.

Embora o óleo essencial de folhas adultas de *E. benthamii* tenha apresentado potencial para inibir a produção de NO, seu composto majoritário, α -pineno, não demonstrou o mesmo efeito sobre os macrófagos peritoneais de camundongos. Novamente, cabe ressaltar, que esses resultados são mais uma evidência que a combinação de componentes voláteis pode influenciar o efeito final de atividades biológicas.

O NO é uma molécula gasosa e altamente tóxica em função de ser um radical livre. As funções fisiológicas do NO são complexas e antagônicas. Essa molécula pode ser benéfica ou potencialmente tóxica, conforme a concentração ou depuração tecidual (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). De maneira geral, o NO está envolvido em diversos processos fisiológicos no homem, incluindo a coagulação do sangue, a neurotransmissão, o controle de pressão sanguínea e a modulação no sistema imunológico (FELDMAN *et al.*, 1993). Assim, problemas inflamatórios e infecciosos, cardiovasculares e neuronais podem estar envolvidos com níveis baixos ou elevados de NO (QUEIROZ; BATISTA, 1999).

NO sintase (NOS) é a enzima que catalisa a formação de NO, sendo que existem três isoformas de NOS: constitutiva (cNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). iNOS catalisa a produção de grande quantidade de NO a partir de L-arginina e oxigênio molecular. Essa enzima é regulada por uma série de vias de sinalização, incluindo o fator de transcrição NF- κ B e as proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Mediadores inflamatórios tais como IL-1, TNF- α ou LPS estimulam a expressão de iNOS em macrófagos de roedores *in vitro*. (MIGUEL, 2010).

Não há relatos na literatura relacionando a inibição da produção de NO e óleos essenciais de *Eucalyptus*, o que caracteriza a importância dos dados obtidos. No entanto, alguns pesquisadores relataram efeito inibitório sobre a produção de NO com o emprego de extratos desse gênero e ainda, outras investigações mostram que óleos voláteis pertencentes a outros gêneros também exercem efeito inibidor. A maioria destes óleos testados são constituídos principalmente por α -pineno, ou seja, contém esse monoterpeno como um dos principais componentes.

Vigo e colaboradores (2004) investigaram o efeito dos extratos de *E. globulus* e *Thymus vulgaris* L. sobre a produção de NO induzida por LPS e interferon- γ (IFN- γ) na linhagem celular J774A.1. Ambos os extratos inibiram significativamente o

aumento da produção de NO de maneira dose-dependente bem como a expressão do gene iNOS. Esse estudo sugeriu que a inibição da produção de NO pode ser devido à atividade sequestradora de NO e/ou a inibição da expressão do gene iNOS a partir dos extratos. Neves *et al.* (2010) investigou cinco óleos essenciais para a identificação de potenciais inibidores da ativação de NF- κ B e da produção de NO induzidas por IL-1 na linhagem de condrócitos C-28/12. O óleo essencial das folhas de *Juniperus oxycedrus* L., composto predominantemente por α -pineno (76%), alcançou a maior inibição na produção de NO. De forma semelhante, uma fração contendo 93% de α -pineno reduziu significativamente a produção de NO e a ativação de NF- κ B. O óleo essencial da espécie *Abies koreana* E. H. Wilson, que contém acetato de bornilo, limoneno e α -pineno como componentes majoritários, demonstrou efeitos inibitórios sobre os mediadores pró-inflamatórios NO e PGE2. Tais efeitos foram relacionados a modulação da expressão de iNOS e COX-2 (Yoon *et al.*, 2009).

Ao contrário do apresentado na literatura, o α -pineno não alterou a produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos no presente estudo. Em contrapartida, o óleo essencial de *E. benthamii*, cujo principal composto é o α -pineno, reduziu significativamente a produção de NO. Esse resultado vem a corroborar que a combinação de componentes voláteis de óleos essenciais podem influenciar o efeito final. Nesse sentido, é possível justificar a diferença de resposta observada para o óleo volátil de *E. benthamii* e seu composto majoritário, α -pineno, para essa atividade biológica.

A inibição da produção de NO provocada pelo óleo essencial em estudo, pode auxiliar na resolução do processo inflamatório, tendo em vista que o NO, em especial pelo seu efeito citotóxico como radical livre, contribui para a lesão tecidual, que ocorre nas inflamações (BRIGANTI; PICARDO, 2003).

Com base nesses resultados, é possível sugerir que o óleo essencial da espécie *E. benthamii* possui constituintes voláteis que em conjunto podem atuar como agente imunomodulador.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. benthamii* E DOS TERPENOS α -PINENO, γ -TERPINENO e TERPINEN-4-OL SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

A ação citotóxica dos óleos essenciais e dos terpenos sobre linhagens de células tumorais foi avaliada por meio do ensaio do MTT em três períodos de tempo: 24, 48 e 72 h.

Os efeitos do óleo essencial de folhas jovens de *E. benthamii* sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A.1 estão demonstrados nas Figuras 32 a 34. A citotoxicidade do óleo essencial sobre todas as linhagens tumorais parece não apresentar muitas variações entre os tempos de exposição de 48 e 72 h, nos quais é possível observar uma redução da viabilidade celular mais pronunciada em relação ao período de 24 h. Na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, observou-se, para todas as linhagens celulares, redução significativa ($P < 0,001$) no número de células viáveis quando comparadas com as células que receberam apenas o veículo (controle), sendo que essa diminuição da viabilidade celular foi similar à provocada pelo agente antitumoral vincristina.

As células Jurkat foram as mais suscetíveis à ação do óleo essencial de folhas jovens de *E. benthamii*. No tempo de exposição de 24 h e para a concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observada uma redução da viabilidade celular para $28,31 \pm 2,51\%$, enquanto a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a viabilidade ficou em $36,31 \pm 1,81\%$, valor similar ao verificado para o controle positivo, $33,45 \pm 1,17\%$. Para os tempos de exposição de 48 e 72 h, houve uma maior redução da viabilidade celular. Em 48 h observaram-se os valores de $8,00 \pm 0,56\%$ e $11,17 \pm 2,21\%$ para $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de óleo essencial, respectivamente, e $6,91 \pm 0,45\%$ para a vincristina. Para o período de exposição de 72 h a porcentagem de viabilidade celular atingiu valores de $4,90 \pm 0,57\%$ a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $6,42 \pm 0,65\%$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando similarmente valores próximos ao da vincristina, $4,80 \pm 0,73\%$.

A linhagem celular HeLa demonstrou um comportamento semelhante ao verificado para as células Jurkat quando em tratamento com o óleo essencial de folhas jovens. Os menores índices de viabilidade celular foram observados para a concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $12,99 \pm 0,32\%$, $9,51 \pm 0,45\%$ e $12,08 \pm 0,60\%$ para os períodos de 24, 48 e 72 h, respectivamente, sendo que para os mesmos períodos de

exposição o controle positivo limitou o número de células viáveis em $46,68 \pm 2,55\%$, $16,83 \pm 2,24\%$ e $15,99 \pm 2,78\%$.

A linhagens celulares B16F10 e J774A.1 foram as que apresentaram maior resistência ao óleo essencial de folhas jovens. Apenas no período de exposição de 24 h e para a linhagem B16F10, é que o óleo essencial a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ alterou a viabilidade celular. Nos demais períodos e para ambas as linhagens, o óleo essencial reduziu a viabilidade celular somente na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A porcentagem de células viáveis da linhagem B16F10 quando incubadas com o óleo essencial a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24, 48 e 72 h foi de $8,52 \pm 1,71\%$, $18,02 \pm 0,46\%$ e $8,93 \pm 2,48\%$, respectivamente. Para a linhagem J774A.1 foram verificados valores de viabilidade de $52,98 \pm 3,38\%$, $8,00 \pm 0,33\%$ e $5,56 \pm 0,34\%$ para a maior concentração do óleo essencial e para os mesmos tempos de exposição, sendo que houve um decréscimo na viabilidade celular bastante pronunciado para o período de 72 h em relação ao tempo de incubação de 24 h.

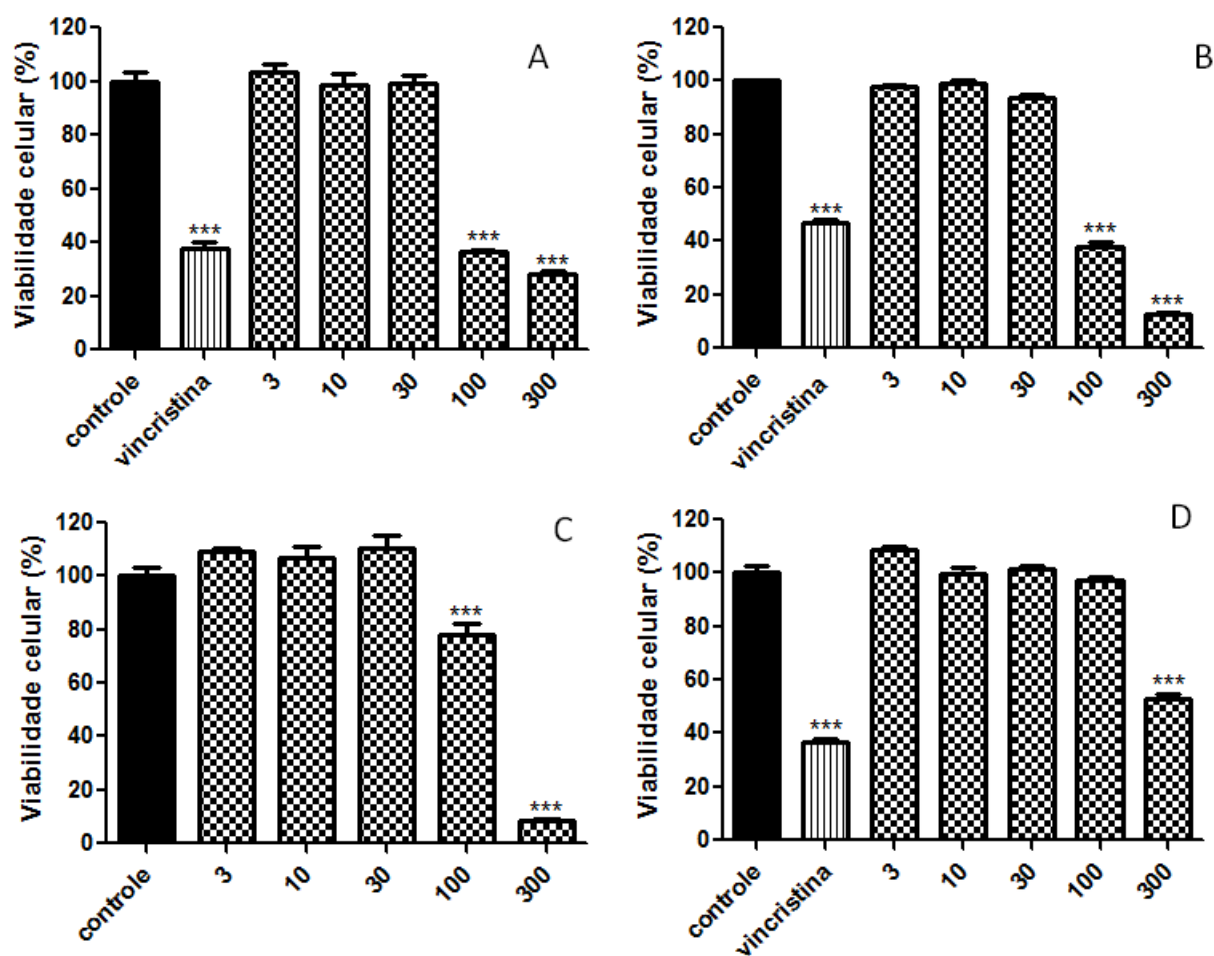


FIGURA 32 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

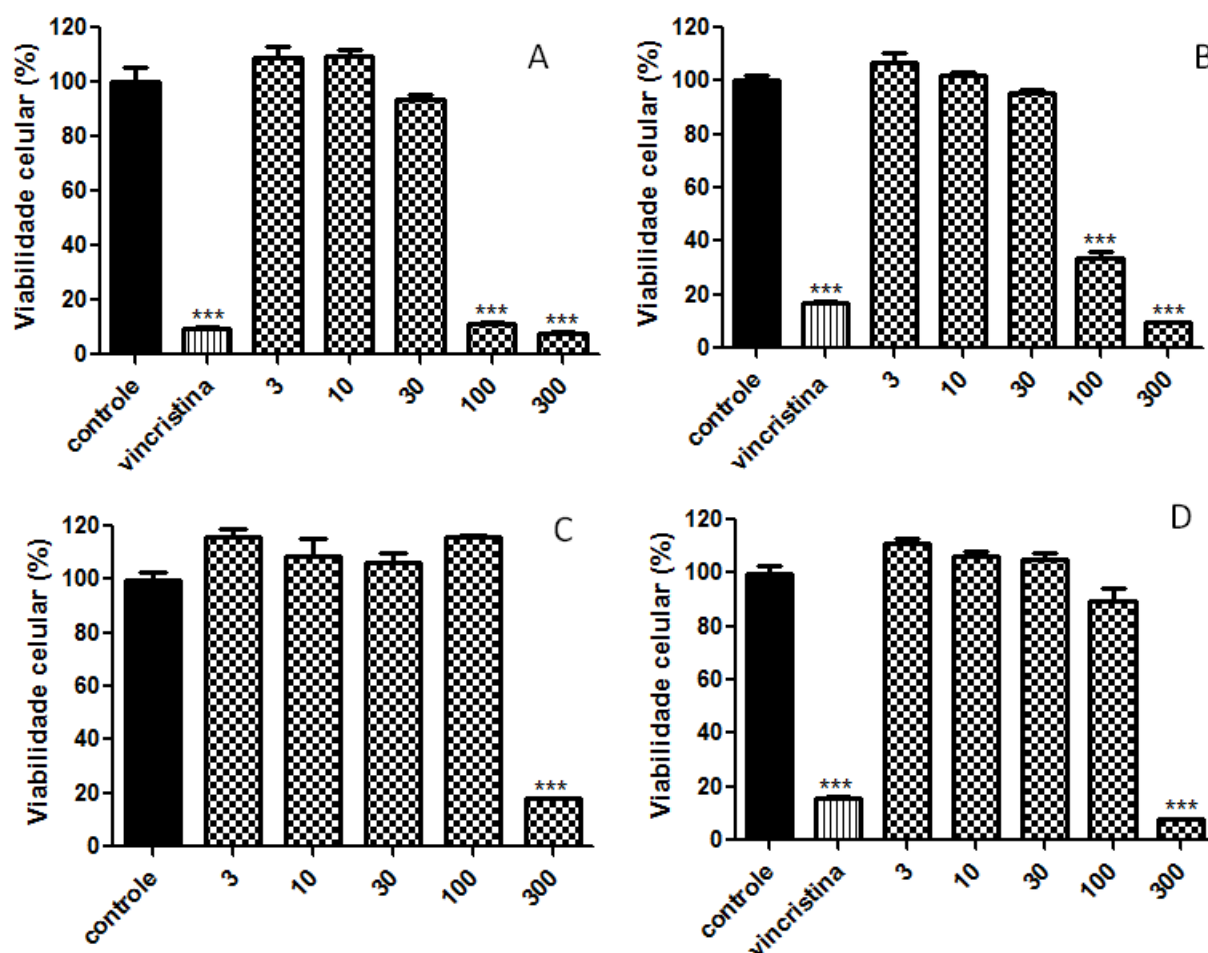


FIGURA 33 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

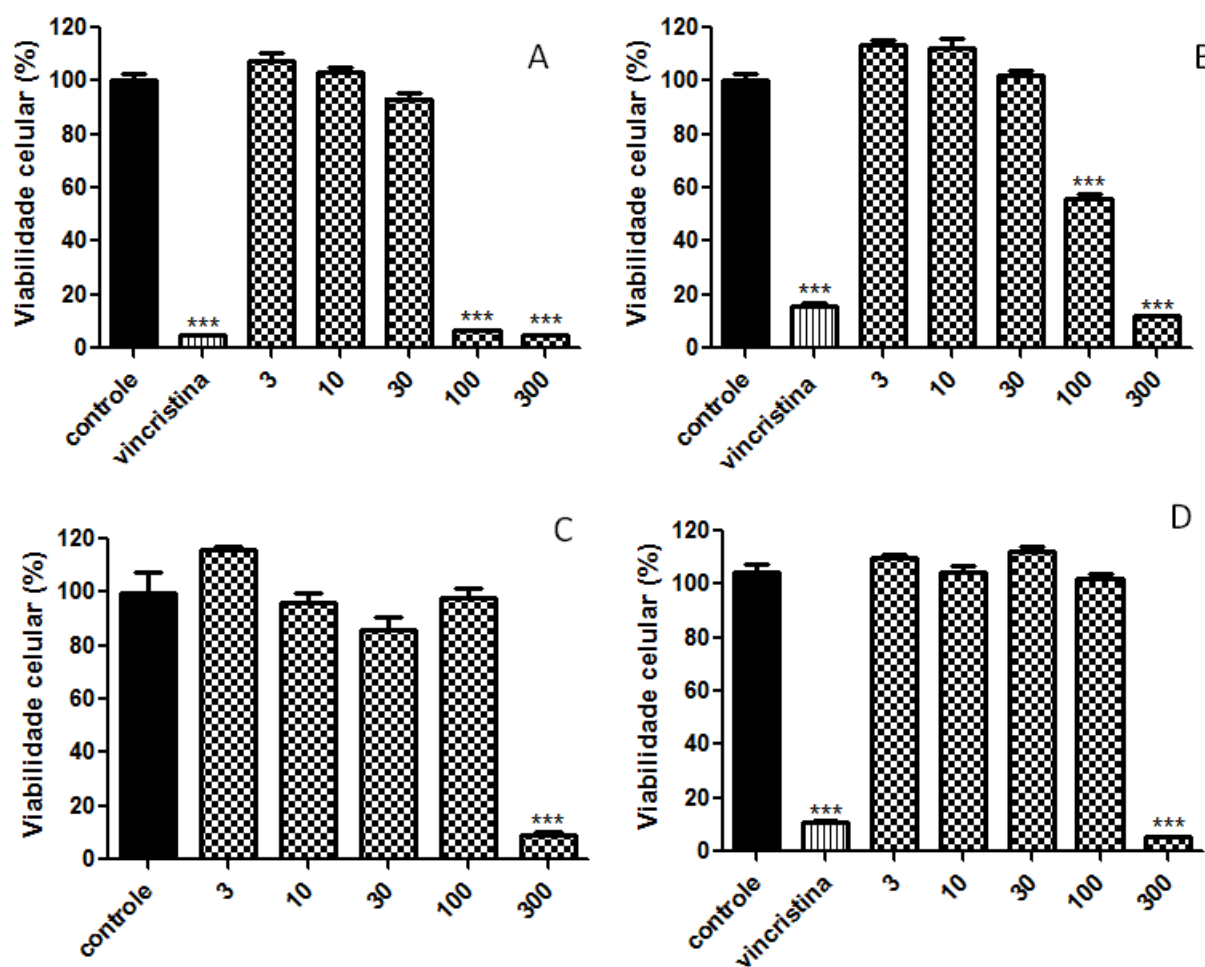


FIGURA 34 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

Os efeitos do óleo essencial de folhas adultas de *E. benthamii* sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A.1 estão apresentados nas Figuras 35, 36 e 37. O óleo volátil obtido de folhas adultas da espécie em estudo demonstra uma ação citotóxica mais pronunciada que o óleo essencial de folhas jovens. Uma redução significativa ($P < 0,001$) na viabilidade celular de todas as linhagens celulares foi observada para o óleo essencial a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em comparação com o grupo de células tratadas apenas com o veículo (controle). Da mesma forma que o observado para a essência de folhas jovens, essa diminuição da viabilidade celular foi semelhante ou até superior à provocada pelo antitumoral vincristina.

De maneira similar ao encontrado para o óleo essencial de folhas jovens, as células Jurkat foram as mais suscetíveis à ação do óleo essencial das folhas adultas de *E. benthamii*. Após 24 h de incubação com o óleo essencial, foram observadas as seguintes porcentagens de viabilidade celular para as concentrações de 300, 100 e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $13,13 \pm 0,64\%$, $19,29 \pm 2,87\%$ e $81,43 \pm 2,62\%$. Para o período de exposição de 48 h, apenas nas concentrações de 300 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observada uma redução significativa da viabilidade: $8,58 \pm 0,32\%$ e $10,61 \pm 0,56\%$, respectivamente. A viabilidade celular ficou ainda mais reduzida após 72 h de exposição ao óleo essencial, com valores de $4,23 \pm 0,31\%$, $4,41 \pm 0,41\%$ e $73,78 \pm 2,23\%$ para o óleo essencial diluído a 300, 100 e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Para as células HeLa foi verificada uma diminuição do número de células viáveis quando da exposição por 24 e 48 h ao óleo essencial nas concentrações de 300, 100 e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram obtidos valores de viabilidade celular de $14,61 \pm 0,35\%$, $56,76 \pm 1,82\%$ e $89,42 \pm 1,10\%$ após 24 horas de incubação com o óleo volátil nas concentrações de 300, 100 e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. E, $8,46 \pm 0,38\%$, $55,76 \pm 4,35\%$ e $81,60 \pm 3,52\%$ após 48 h de incubação com o óleo volátil diluído também a 300, 100 e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Porém, após o período de 72 h, o óleo essencial não demonstrou efeitos citotóxicos significativos na concentração de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os menores índices de viabilidade celular foram observados para a concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($12,18 \pm 1,92\%$) e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($63,08 \pm 6,22\%$), os quais foram até mesmo superiores aos verificados para o período de incubação de 48 h. Uma das explicações para esse resultado pode ser a metabolização e/ou a volatilização de alguns componentes do óleo essencial que modulam o efeito avaliado.

Uma diminuição da viabilidade das células B16F10 foi constatada quando essas ficaram expostas ao óleo essencial nas concentrações de 300 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A porcentagem de células viáveis quando incubadas com o óleo essencial a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24, 48 e 72 h foi de $9,82 \pm 1,77\%$, $18,80 \pm 0,64\%$ e $9,68 \pm 0,85\%$, respectivamente. Enquanto que os valores obtidos para o óleo volátil a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24, 48 e 72 h foram de $59,29 \pm 7,84\%$, $33,33 \pm 4,64\%$ e $47,63 \pm 11,69\%$, respectivamente.

Para a linhagem J774A.1 foram verificados valores de viabilidade celular de $35,27 \pm 1,96\%$, $7,52 \pm 0,47\%$ e $5,40 \pm 0,32\%$ para a maior concentração do óleo essencial e para os períodos de exposição de 24, 48 e 72 h, respectivamente. A concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de induzir a um decréscimo no número de células desta linhagem para $64,45 \pm 9,06\%$, somente após o período de 48 h.

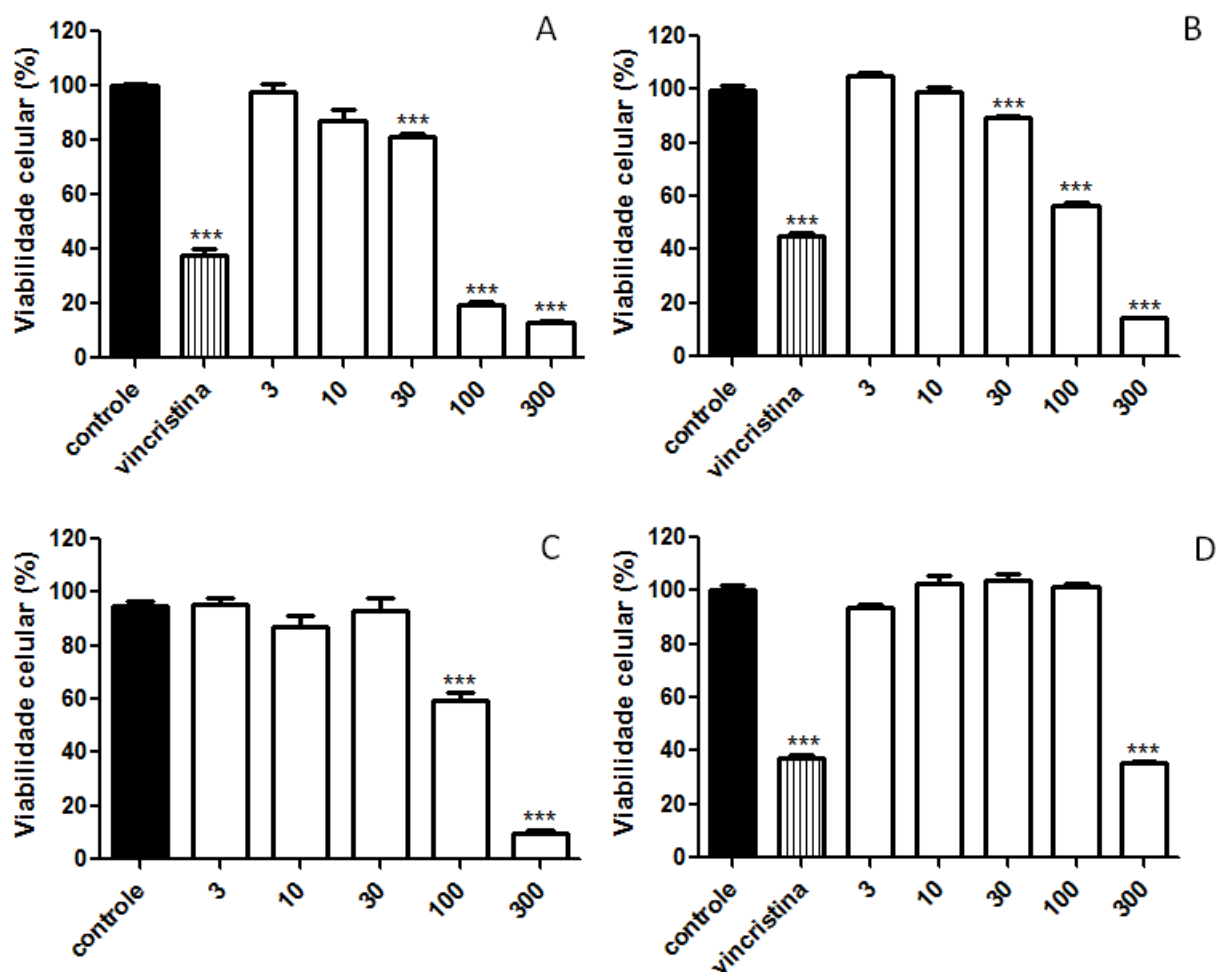


FIGURA 35 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

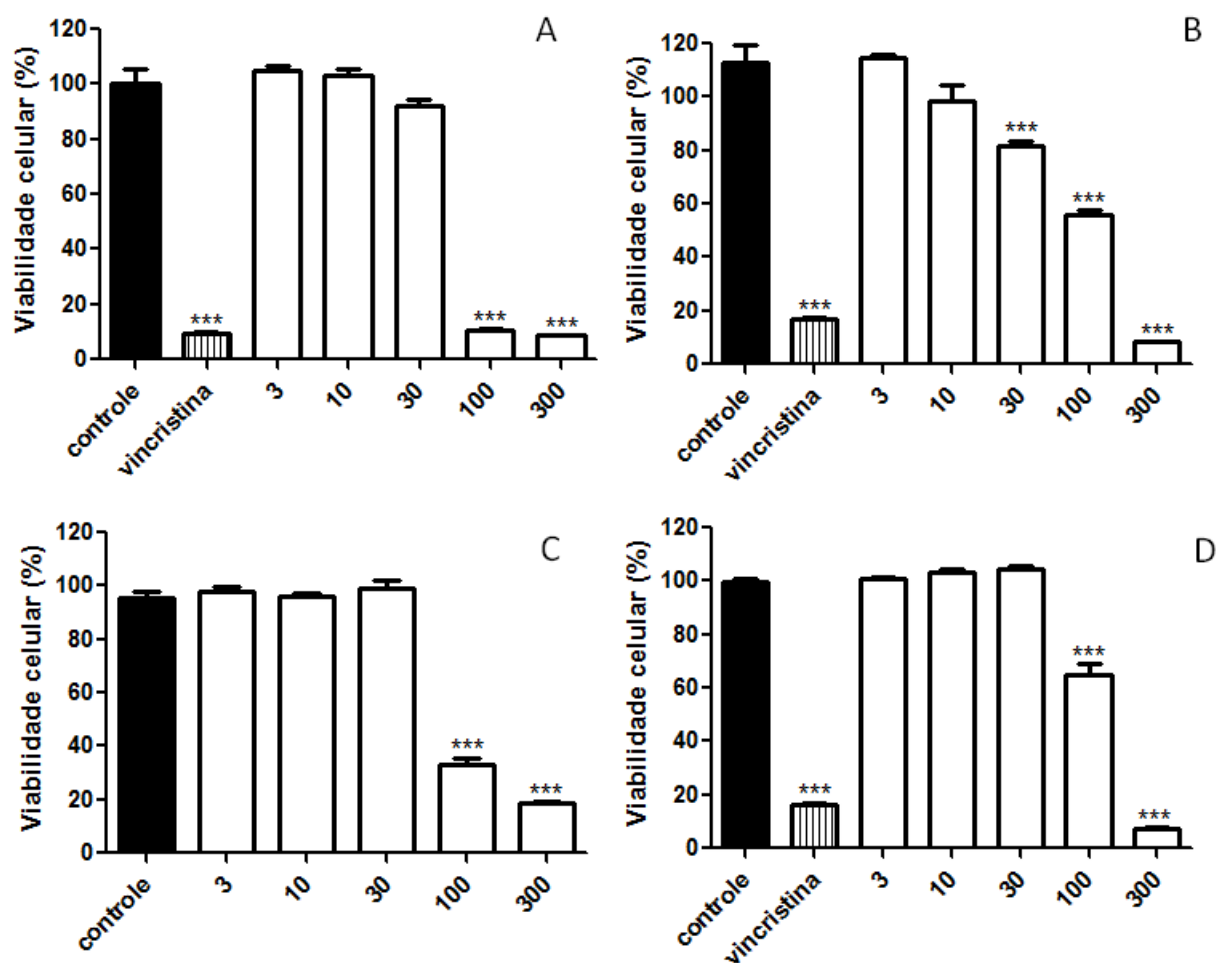


FIGURA 36 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

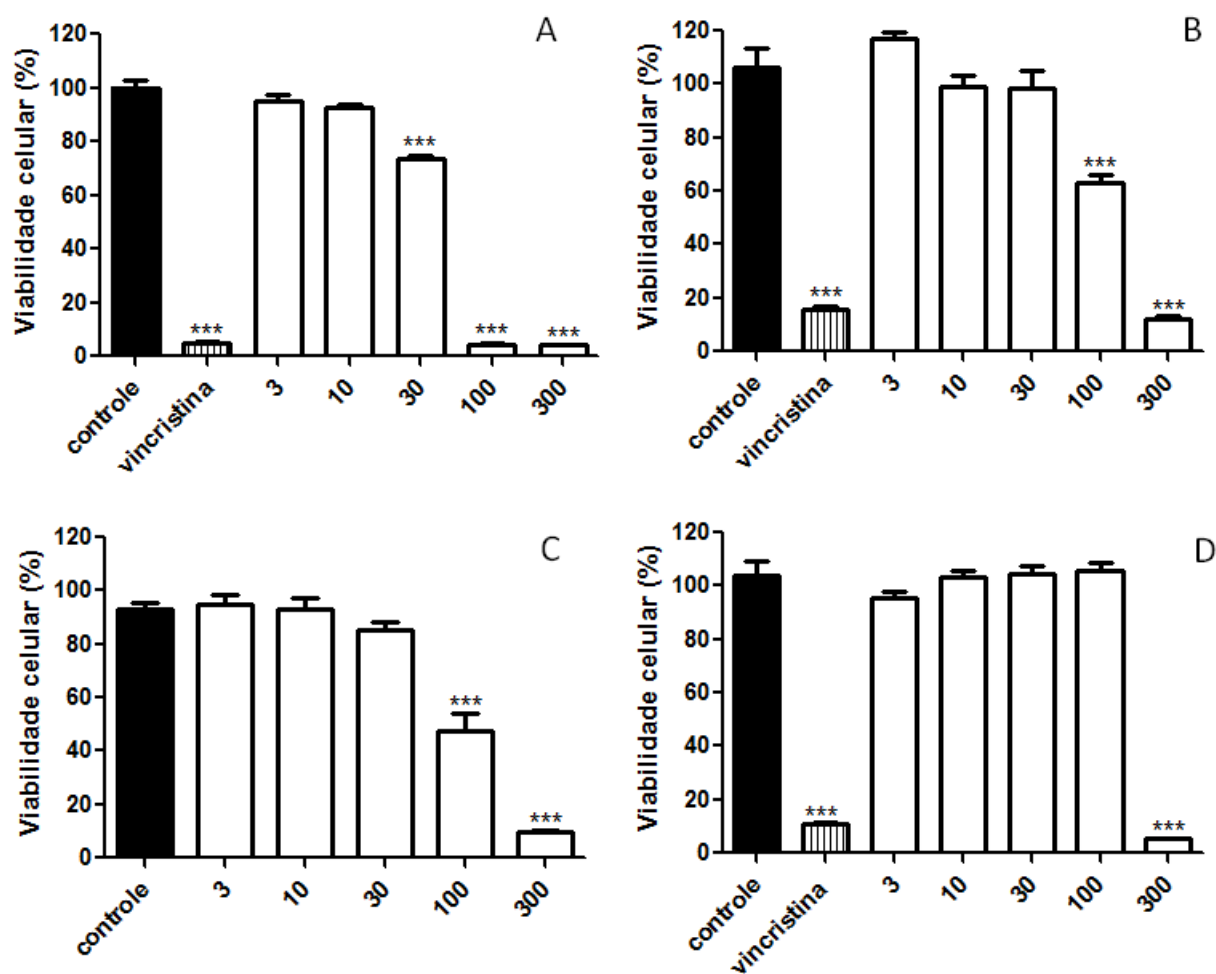


FIGURA 37 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O ÓLEO ESSENCIAL E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

A ação citotóxica do monotерpeno hidrocarboneto α -pineno sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A.1 está indicada nas Figuras 38 a 40. O α -pineno exerceu uma ação citotóxica apenas nas células Jurkat. As demais linhagens não foram suscetíveis à ação desse composto, mantendo a mesma viabilidade celular que a apresentada pelas células tratadas apenas com o veículo (controle). Uma redução significativa ($P < 0,001$) na porcentagem de células Jurkat viáveis para $16,68 \pm 2,65\%$, $7,13 \pm 1,05\%$ e $20,19 \pm 3,57\%$ foi observada somente na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e nos períodos de exposição de 24, 48 e 72 h, respectivamente.

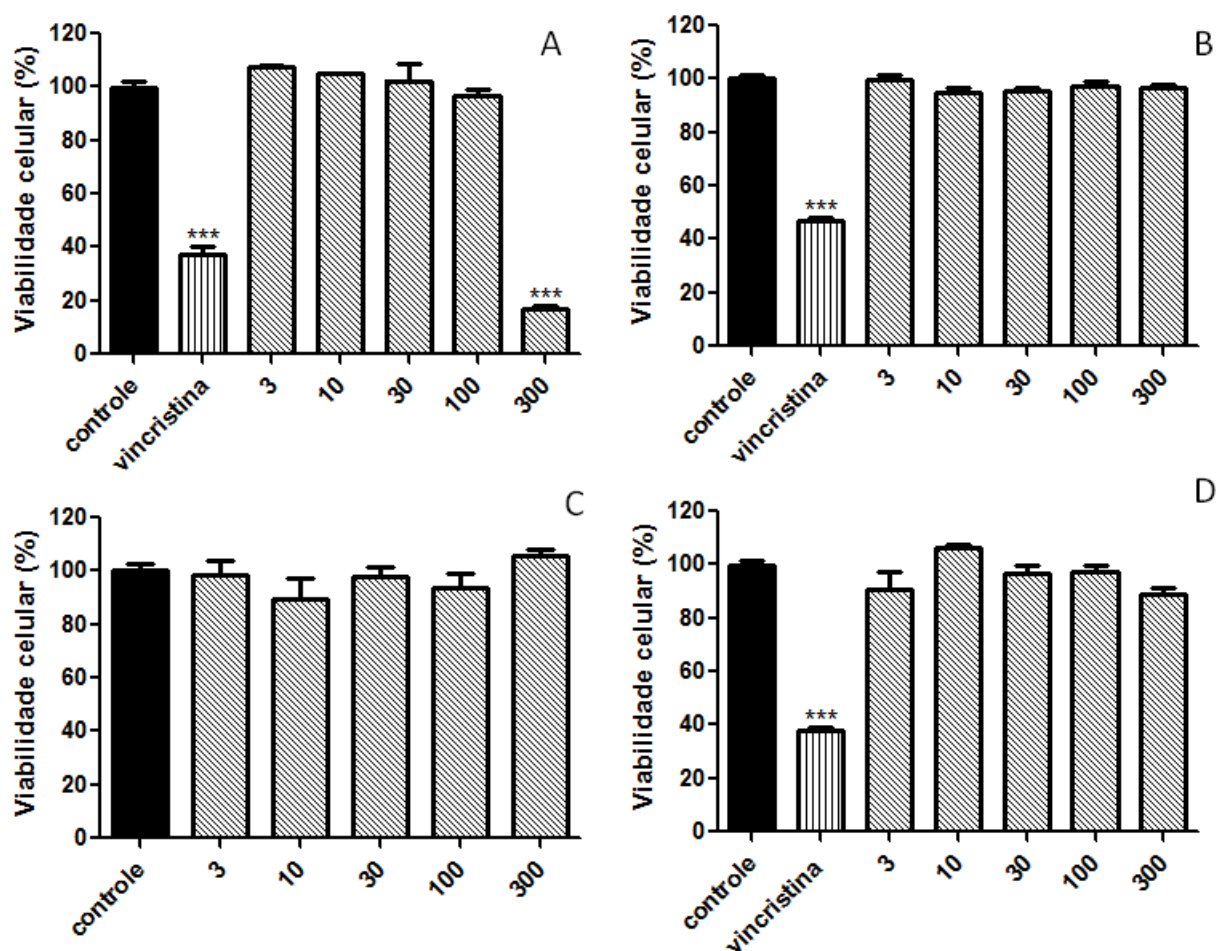


FIGURA 38 – EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O TERPENOS E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

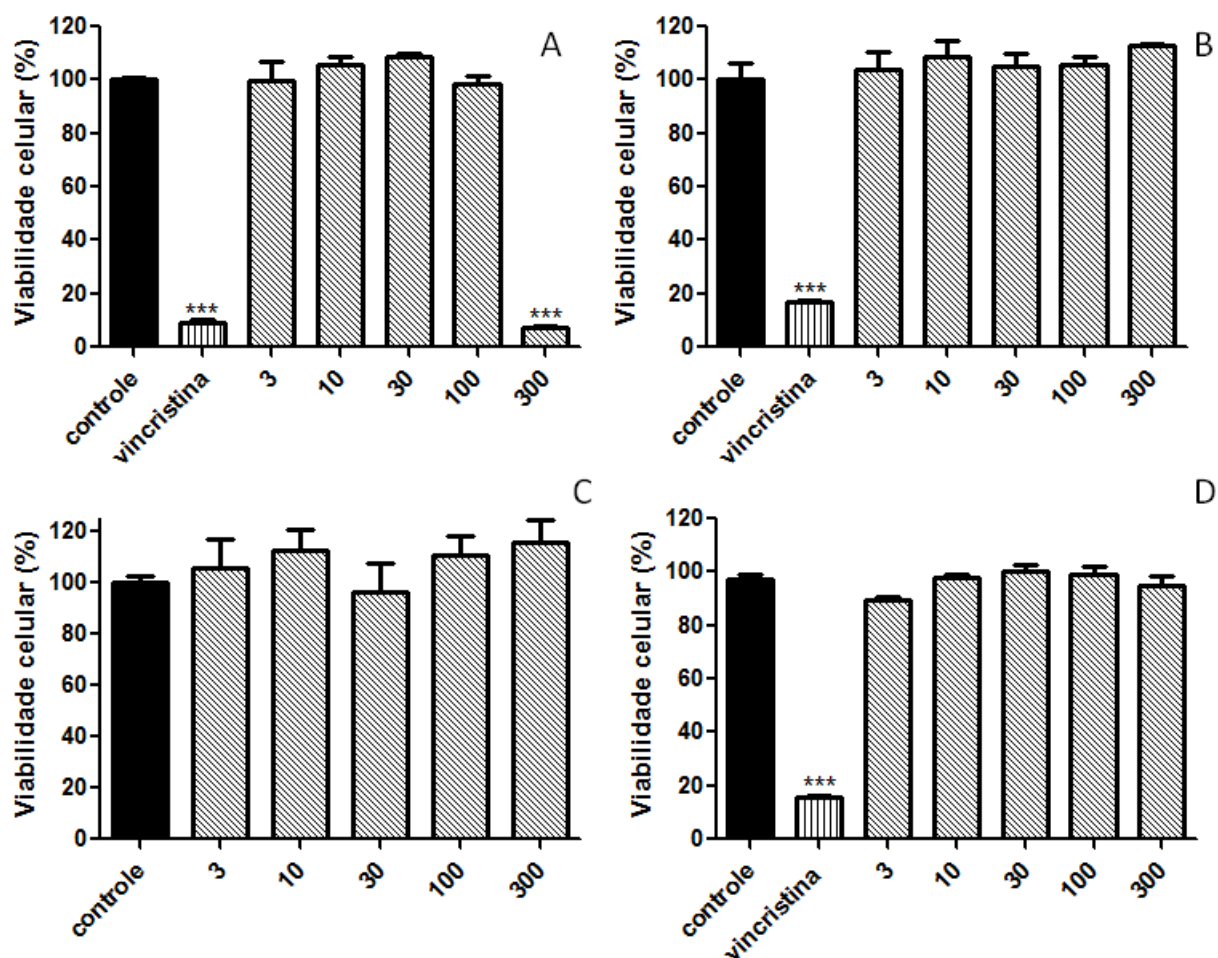


FIGURA 39 – EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

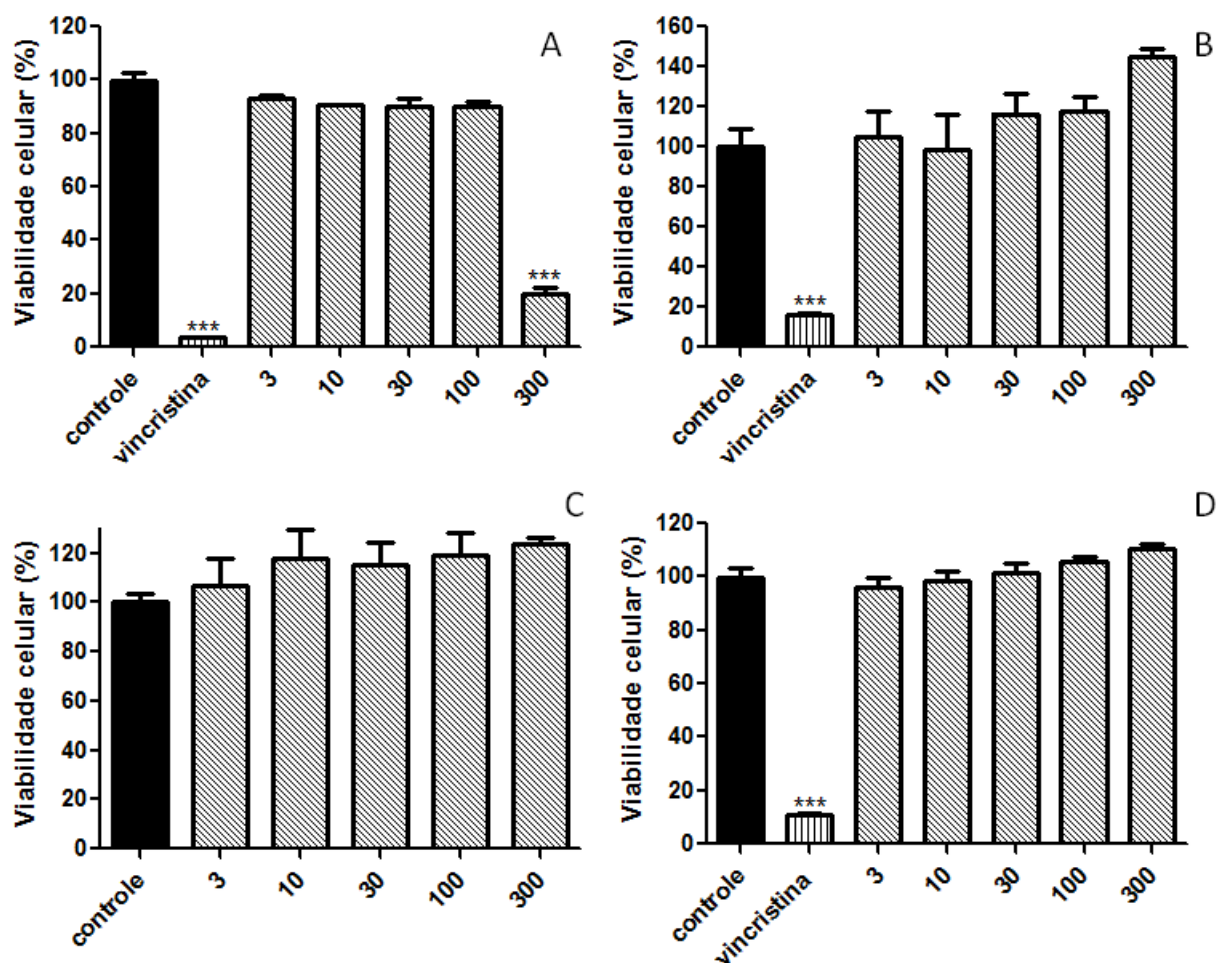


FIGURA 40 – EFEITO DO α -PINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

Nas Figuras 41, 42 e 43 estão demonstrados os efeitos do monoterpene γ -terpineno sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A.1. O γ -terpineno apresentou propriedades citotóxicas apenas para a linhagem celular Jurkat. Após 24 h de incubação, foram observadas as seguintes porcentagens de viabilidade celular para as concentrações de 300, 100 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: $21,19 \pm 0,21\%$, $77,00 \pm 8,27\%$ e $72,90 \pm 4,015\%$, respectivamente. Para o período de exposição de 48 h, valores de viabilidade celular de $14,85 \pm 4,55\%$, $65,43 \pm 10,81\%$ e $73,05 \pm 6,08\%$, foram determinados para o γ -terpineno diluído a 300, 100 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Após 72 h de exposição ao composto, foi constatada uma viabilidade celular de $7,13 \pm 1,10\%$ somente para a diluição de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Porém, para esse composto volátil, não foi observada citotoxicidade frente às células HeLa, B16F10 e J774A.1, até a concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

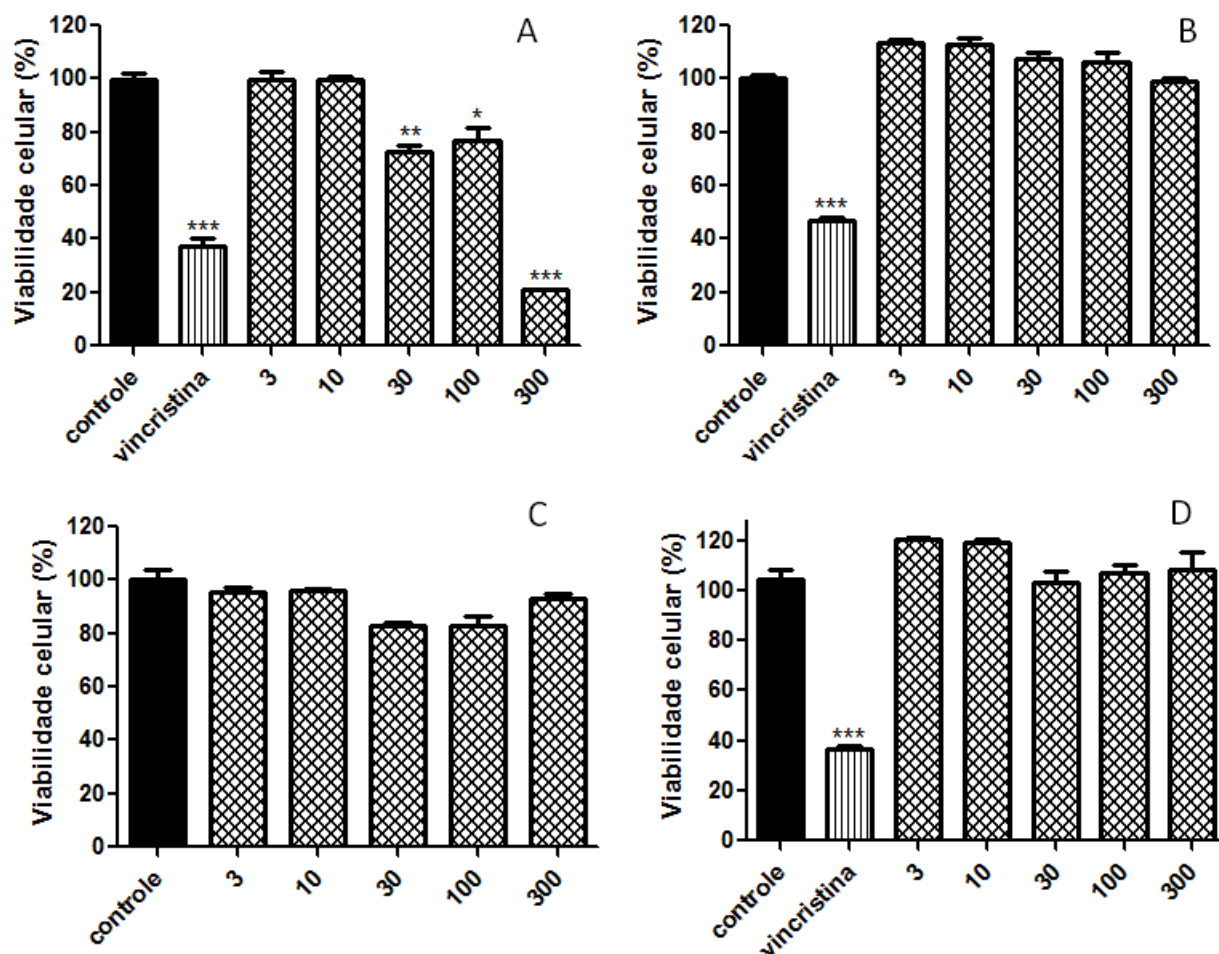


FIGURA 41 – EFEITO DO γ -TERPINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

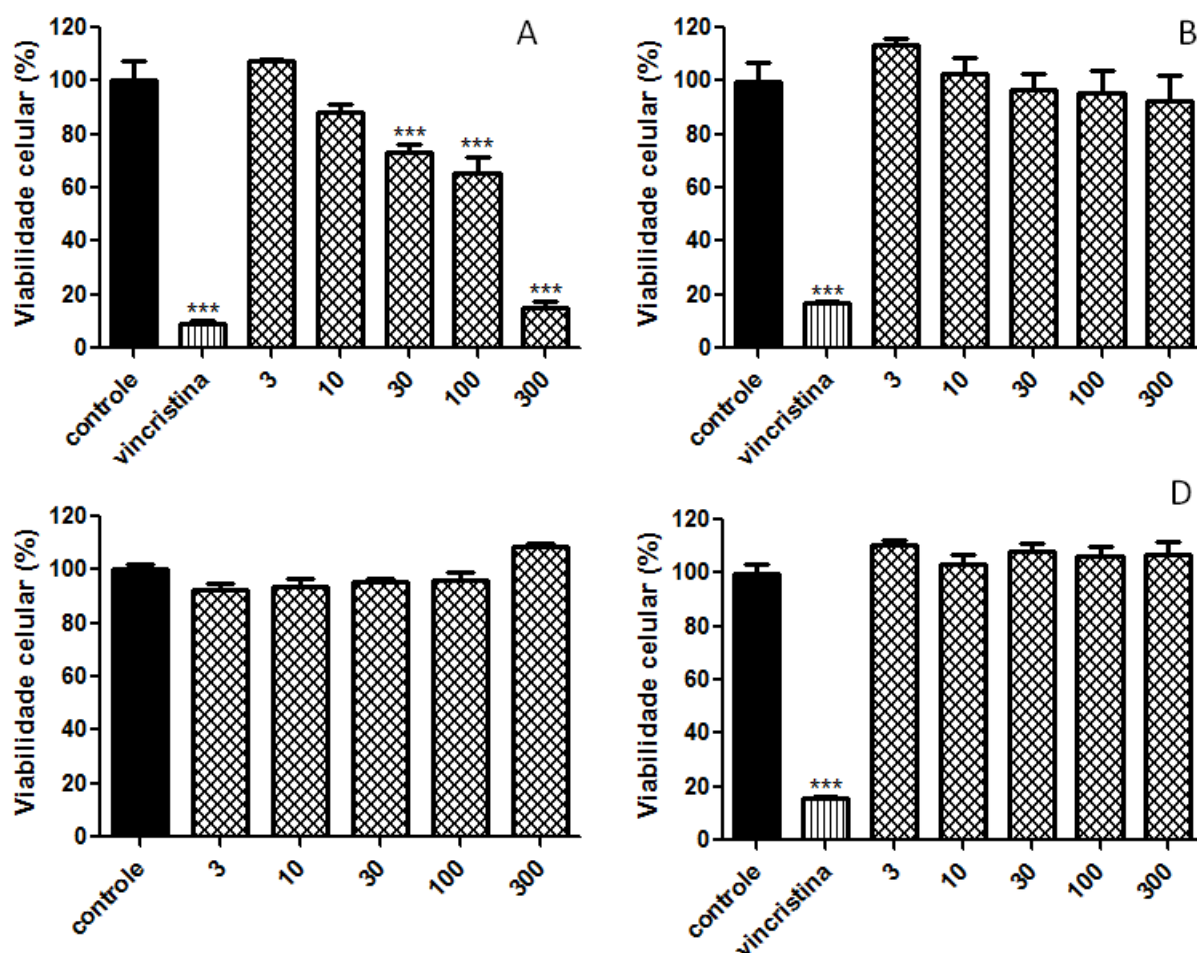


FIGURA 42 – EFEITO DO γ -TERPINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O TERPENOS E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

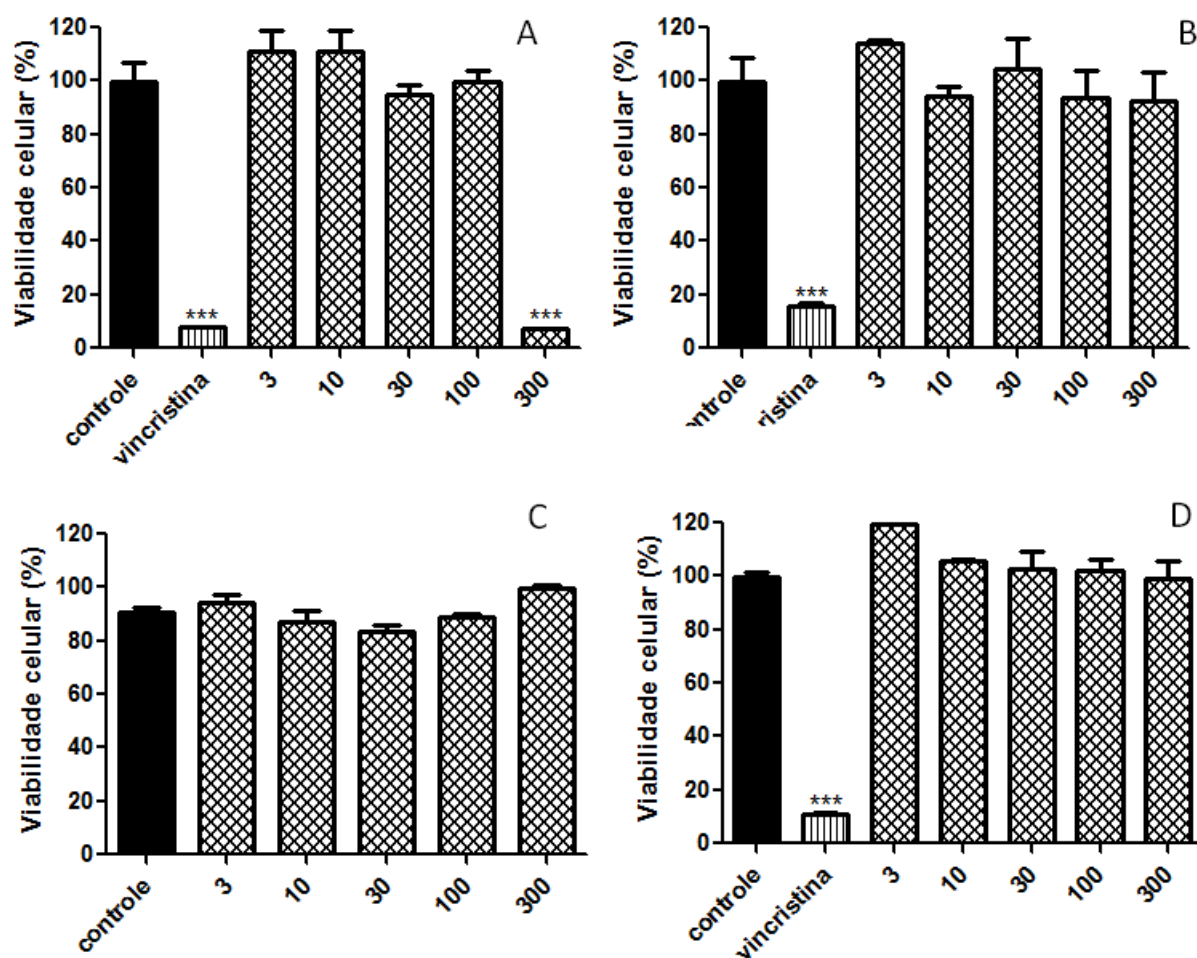


FIGURA 43 – EFEITO DO γ -TERPINENO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O TERPENEO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

Os efeitos do composto terpinen-4-ol sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A.1 estão sintetizados nas Figuras 44 a 46. O terpinen-4-ol mostrou um efeito citotóxico contra células Jurkat comparável ao dos óleos essenciais avaliados.

As células Jurkat foram as mais suscetíveis à ação do monoterpeno terpinen-4-ol. Após 24 h de incubação, foram observadas as seguintes porcentagens de viabilidade celular para as concentrações de 300, 100, 30 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: $21,61 \pm 1,06\%$, $38,35 \pm 4,66\%$, $70,44 \pm 3,12\%$ e $68,03 \pm 3,34\%$. A viabilidade celular ficou mais reduzida após 48 h de exposição ao composto, com valores de $12,58 \pm 5,37\%$, $21,17 \pm 4,81\%$, $70,05 \pm 5,52\%$ e $65,18 \pm 1,87\%$ para o terpinen-4-ol diluído a 300, 100, 30 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Para o período de exposição de 72 h, apenas nas concentrações de 300 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observada uma redução significativa da viabilidade das células: $6,97 \pm 1,16\%$ e $19,47 \pm 2,50\%$, respectivamente.

Para a linhagem HeLa foi observada uma citotoxicidade após 24 h de incubação com o composto a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (viabilidade de $65,85 \pm 5,77\%$), porém nos demais tempos de exposição, as células não sofreram redução da viabilidade.

Terpinen-4-ol apresentou baixa citotoxicidade para as células B16F10 durante os três tempos de exposição, não alterando a viabilidade das células dessa linhagem.

A atividade citotóxica do terpinen-4-ol frente às células tumorais J774A.1 foi observada somente na concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As porcentagens de viabilidade celular verificadas para os períodos de 24, 48 e 72 h foram de $22,63 \pm 2,32\%$, $11,30 \pm 2,05\%$ e $11,69 \pm 0,67\%$, respectivamente.

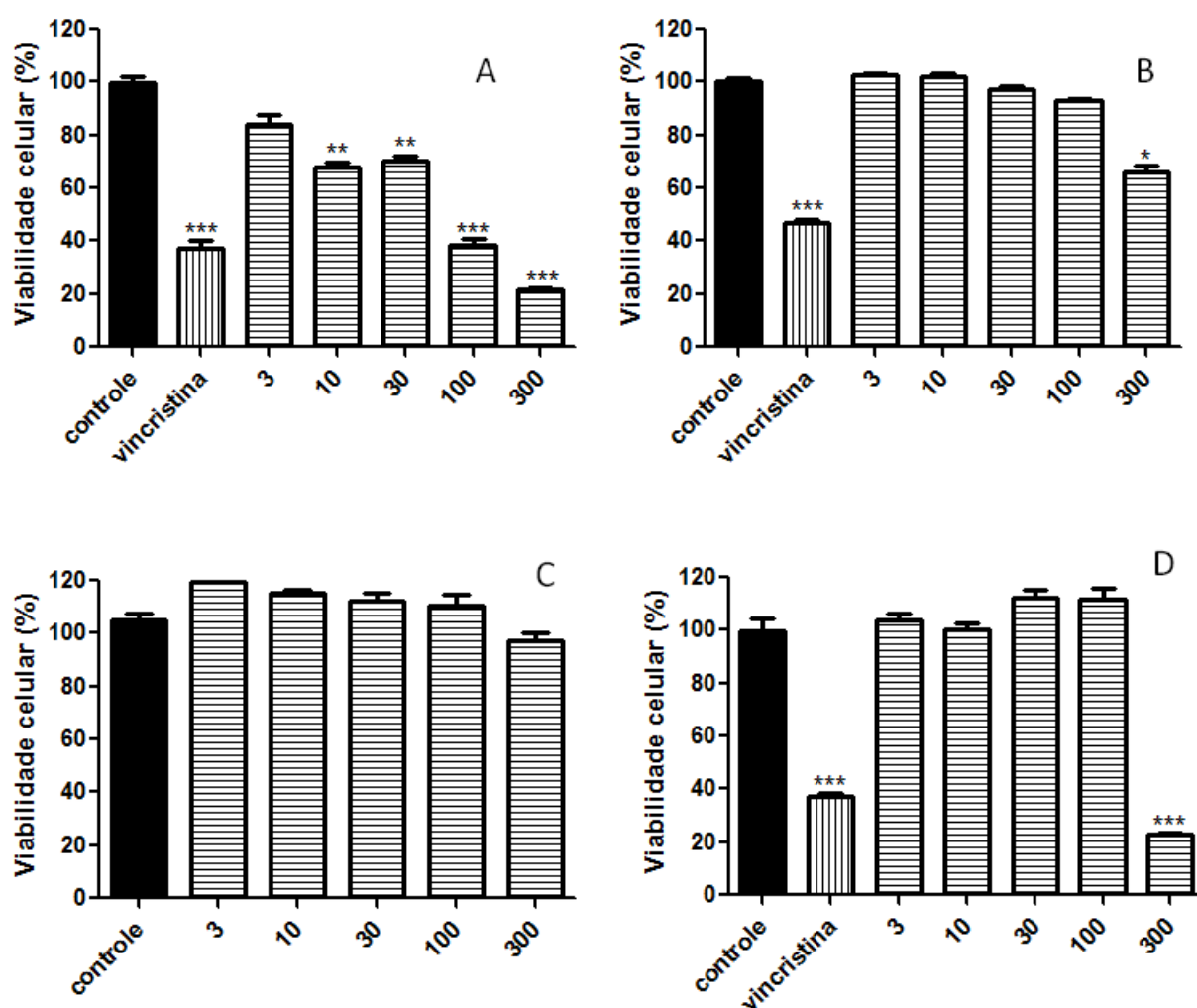


FIGURA 44 – EFEITO DO TERPINEN-4-OL SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

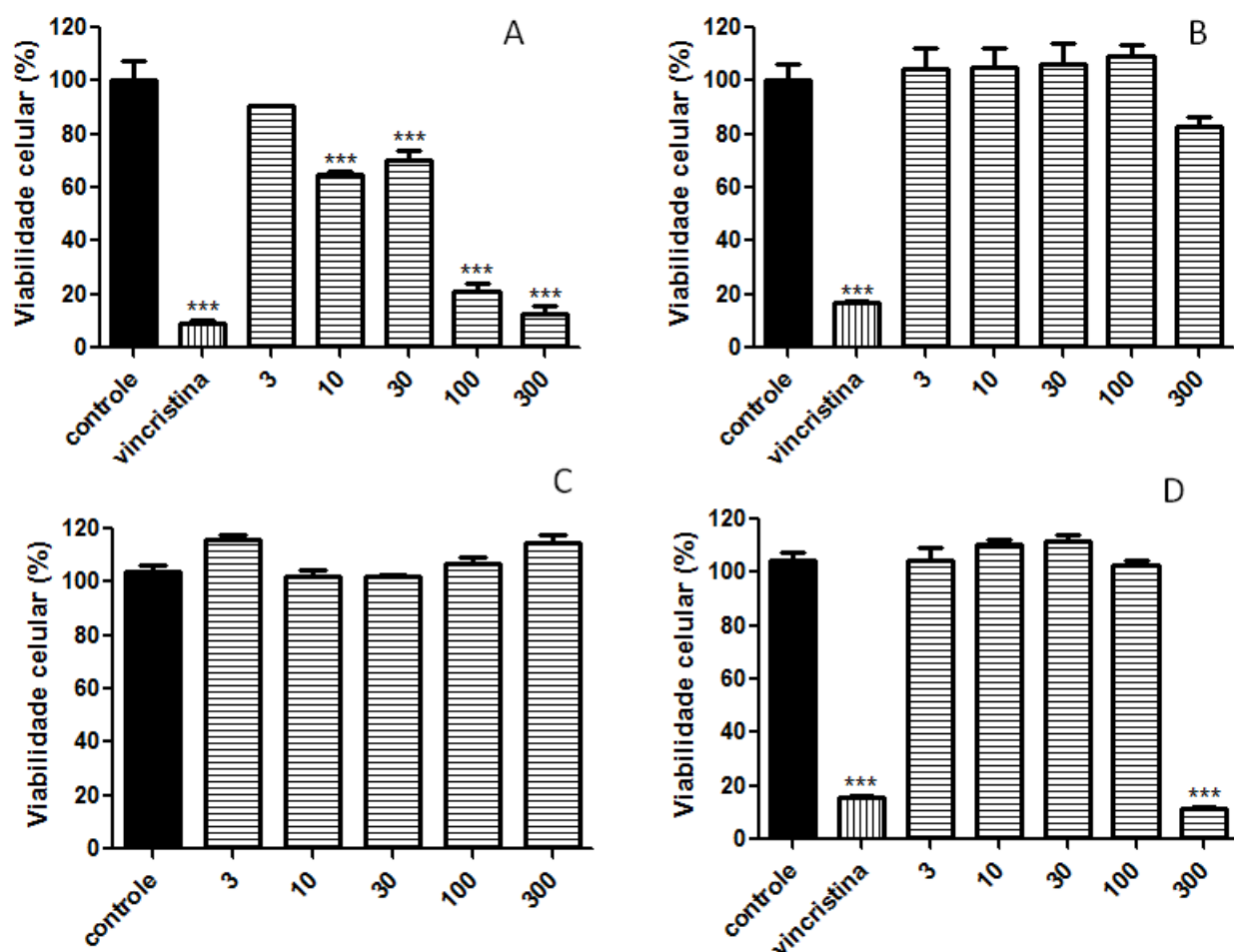


FIGURA 45 – EFEITO DO TERPINEN-4-OL SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 48 H COM O TERPENÓ E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

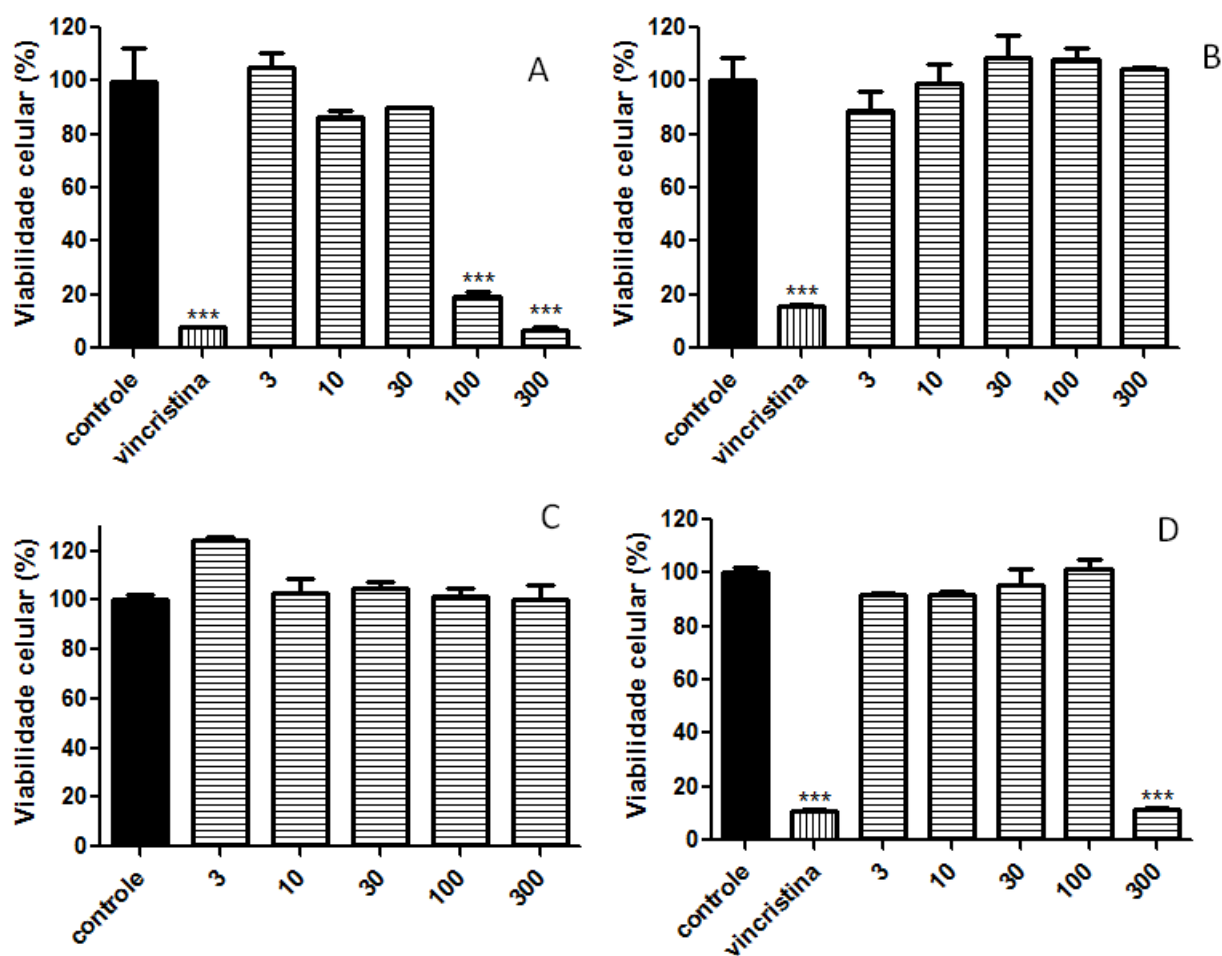


FIGURA 46 – EFEITO DO TERPINEN-4-OL SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT (A), HELA (B), B16F10 (C) E J774A.1 (D). AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 72 H COM O TERPENO E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1} FOI EMPREGADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-10). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

Utilizando os resultados de viabilidade celular obtidos por meio do ensaio de redução do MTT, foram obtidos os valores de IC_{50} dos óleos essenciais e terpenos para as diferentes linhagens tumorais, os quais estão expressos nas Tabelas 06 e 07, considerando-se os períodos de tratamento de 24 e 72 h, respectivamente. Em geral, os óleos voláteis obtidos a partir de folhas jovens e adultas de *E. benthamii* mostraram-se tóxicos para as células estudadas, todavia com diferentes perfis. Em relação ao óleo essencial extraído de folhas jovens (OEFJ), as células Jurkat foram mais sensíveis ($IC_{50} = 108,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 h e $IC_{50} = 56,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h) quando comparadas com a linhagem J77A.1 ($IC_{50} = 287,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 h e $IC_{50} = 166,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h). O óleo essencial obtido de folhas adultas (OEFA) demonstrou o mesmo efeito para essas duas linhagens de células. Com IC_{50} de $36,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o óleo essencial de folhas jovens caracterizou-se como mais citotóxico para a linhagem Jurkat, durante o tempo de exposição de 72 h. Dados semelhantes também foram observados para os terpenos α -pineno, γ -terpineno e terpinen-4-ol em que as células Jurkat foram mais suscetíveis a esses compostos ($IC_{50} = 192,42, 136,60$ e $50,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 h e $IC_{50} = 186,09, 156,92$ e $54,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h, respectivamente) em relação a linhagem J774A.1. Os terpenos α -pineno e γ -terpineno não apresentaram atividade citotóxica para a linhagem J77A.1, enquanto que o composto terpinen-4-ol revelou $220,02$ e $189,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de IC_{50} para os tempos de exposição de 24 e 72 h, respectivamente. Em relação à citotoxicidade contra células HeLa, os óleos voláteis de folhas jovens e adultas de *E. benthamii* revelaram IC_{50} de $84,24$ e $110,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 h e $120,57$ e $101,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h, respectivamente. O α -pineno, o γ -terpineno e o terpinen-4-ol não reduziram a viabilidade celular desta linhagem tumoral em nenhum dos três períodos de exposição. O mesmo padrão de resposta foi obtido a partir da análise de viabilidade das células B16F10 em relação a esses três compostos terpênicos. Por outro lado, as essências de folhas jovens e adultas de *E. benthamii* alteraram a viabilidade celular da linhagem B16F10 com IC_{50} de $139,14$ e $93,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o tempo de exposição de 24 h e $156,55$ e $92,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o período de 72 h, respectivamente.

TABELA 06 – IC₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE *E. benthamii* E DOS COMPOSTOS α -PINENO, γ -TERPINENO E TERPINEN-4-OL PARA CÉLULAS TUMORAIS, DETERMINADOS PELA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CULTIVOS DE 24 H POR MEIO DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT

Células	IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	OEFJ	OEFA	α -pineno	γ -terpineno	terpinen-4-ol
Jurkat	108,33 \pm 1,83	54,96 \pm 5,80	192,42 \pm 9,38	136,6 \pm 10,67	50,20 \pm 13,03
HeLa	84,24 \pm 5,94	110,02 \pm 2,89	> 300	> 300	> 300
B16F10	139,14 \pm 11,37	93,54 \pm 9,80	> 300	> 300	> 300
J774A.1	287,98 \pm 3,54	252,55 \pm 1,91	> 300	> 300	220,02 \pm 7,15

NOTA: IC₅₀: concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ que induz morte celular em 50% das células. Os resultados estão expressos como média \pm DP

OEFJ= óleo essencial de folhas jovens

OEFA= óleo essencial de folhas adultas

TABELA 07 – IC₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE *E. benthamii* E DOS COMPOSTOS α -PINENO, γ -TERPINENO E TERPINEN-4-OL PARA CÉLULAS TUMORAIS, DETERMINADOS PELA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CULTIVOS DE 72 H POR MEIO DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT

Células	IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	OEFJ	OEFA	α -pineno	γ -terpineno	terpinen-4-ol
Jurkat	56,51 \pm 1,48	36,63 \pm 3,52	186,09 \pm 37,98	156,92 \pm 10,22	54,84 \pm 3,85
HeLa	120,57 \pm 6,22	101,90 \pm 19,47	> 300	> 300	> 300
B16F10	156,55 \pm 13,85	92,60 \pm 10,75	> 300	> 300	> 300
J774A.1	166,87 \pm 5,77	178,85 \pm 6,11	> 300	> 300	189,7 \pm 14,74

NOTA: IC₅₀: concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ que induz morte celular em 50% das células. Os resultados estão expressos como média \pm DP

OEFJ= óleo essencial de folhas jovens

OEFA= óleo essencial de folhas adultas

Como anteriormente mencionado, o ensaio de redução do MTT é um teste colorimétrico cuja absorbância reflete a viabilidade celular. Esse teste é baseado na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem, no meio intracelular, o sal solúvel de tetrazólio a cristais insolúveis de formazan de coloração violeta. (MOSMANN, 1983). Durante muito tempo se atribuiu a redução do MTT a desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Porém, foi comprovado que a redução do MTT em células ativas ocorre principalmente fora da mitocôndria, por desidrogenases não mitocondriais (BERRIDGE; TAN, 1993; LIU *et al.*, 1997). Acredita-se que o MTT seja internalizado nas células por meio de um processo de endocitose e que o formazan, originado a partir da redução do MTT, acumula-se em endossomas/lisossomas, para ser em seguida secretado por exocitose (LIU *et al.*, 1997). Dessa forma, esse ensaio é apropriado para avaliar a viabilidade celular, tendo em vista que a endocitose é um processo que somente ocorre em células viáveis (LIU *et al.*, 1997). Além disso, o ensaio do MTT representa um teste de citotoxicidade empregado para uma variedade de compostos químicos.

Diversas investigações têm demonstrado que os óleos voláteis apresentam atividade supressiva contra o câncer tanto *in vitro* quanto *in vivo*, quando testados em linhagens de células humanas de câncer (DE SOUSA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004; CALCABRINI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2001; BUHAGIAR *et al.*, 1999). Os efeitos citotóxicos verificados para os óleos essenciais podem estar relacionados às propriedades citotóxicas desses compostos. Tal como típicas moléculas lipofílicas, os óleos essenciais passam pela membrana citoplasmática das células, afetando a estrutura de suas diferentes camadas e torna-a permeável. Desse modo, a citotoxicidade pode estar relacionada a danos de membrana. Além disso, também foi relatado que os óleos essenciais podem causar danos na membrana mitocondrial, uma vez que provocam a despolarização mitocondrial, diminuindo o potencial de membrana (VERCESI *et al.*, 1997; NOVGORODOV; GUDZ, 1996; RICHTER; SCHLEGEL, 1993) e também alterando a fluidez das membranas, que se tornam mais permeáveis. Esses mecanismos adicionais relatados para óleos essenciais também podem ter contribuído para o efeito verificado para os óleos voláteis em estudo. Deve-se acrescentar a isso, o fato de que as essências representam misturas complexas de numerosas moléculas que sinergicamente podem produzir efeitos biológicos potencialmente maiores que seus constituintes individuais.

Nesse sentido, os óleos voláteis de *E. benthamii* são potencialmente eficazes para alterar a atividade enzimática celular e iniciar alterações metabólicas que conduzem à morte celular. Considerando a atividade citotóxica sobre as quatro linhagens tumorais estudadas, com base no ensaio do MTT, os óleos essenciais demonstraram melhores resultados que o α -pineno e o γ -terpineno, particularmente para as células Jurkat, HeLa e B16F10. Esses valores podem ser atribuídos a um efeito sinérgico entre os monoterpenos e sesquiterpenos presentes nos óleos voláteis. Nesse sentido, para fins biológicos, o sinergismo parece ser mais significativo do que os seus compostos isolados, devido ao fato de que a atividade dos principais componentes pode ser modulada por outras moléculas encontradas em menor concentração na constituição do óleo essencial. Além disso, acredita-se que vários componentes dos óleos voláteis podem desempenhar um papel determinante na penetração celular (CAL, 2006), fixação nas membranas e distribuição celular, colaborando para um efeito potencializado. Embora os óleos essenciais estudados tenham indicado propriedades citotóxicas contra as células tumorais, seu constituinte majoritário, α -pineno, não apresentou o mesmo potencial, tendo em vista sua baixa performance como agente citotóxico. Esse resultado é mais uma prova que a combinação de componentes voláteis de óleos essenciais podem influenciar no efeito citotóxico final. E, além desse efeito sinérgico, outros constituintes presentes no óleo essencial e não avaliados nesse trabalho, também poderiam ser os principais responsáveis pelo efeito citotóxico observado.

O monoterpeno α -pineno tem sido relacionado às atividades antibacteriana (LEITE, 2007), anti-inflamatória (MARTIN *et al.*, 1993; ZHOU *et al.*, 2004) e inseticida e pode ser usado para fins industriais na síntese de cânfora e produtos de perfumaria (THE MERCK INDEX, 2001). Alguns estudos envolvendo o α -pineno demonstram o potencial citotóxico desse composto. O α -pineno exibiu citotoxicidade *in vitro* frente às células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (SETZER *et al.*, 1999). Outra investigação relata que o α -pineno isolado de *Schinus terebinthifolius* Raddi induziu apoptose e conferiu protecção antimetastática em um modelo de melanoma. Também foi demonstrado que esse componente terpênico, embora inativo frente às linhagens C32 (melanoma amelanótico humano) e ACHN (adenocarcinoma humano), poderia atuar em sinergia com outros componentes antiproliferativos de óleos essenciais e produzir tais efeitos (LOIZZO *et al.*, 2008). Zhou e colaboradores (2004) verificaram que o α -pineno inibe a translocação nuclear

de NF- κ B, que regula a expressão de genes que desempenham papéis cruciais na apoptose e imunomodulação. Apesar dos vários trabalhos sobre o potencial citotóxico desse monoterpeneo contra células tumorais, não foi observada ação citotóxica em relação às linhagens celulares J774A.1, B16F10 e HeLa.

O monoterpeneo hidrocarboneto γ -terpineno apresentou baixa citotoxicidade para a linhagem celular Jurkat. Porém, não foi observado efeito citotóxico contra as células HeLa, B16F10 e J774A.1 abaixo de 300 $\mu\text{g/mL}$. Há poucos estudos relacionando γ -terpineno e atividade citotóxica e/ou efeito anticancerígeno. Foram notados efeitos antitumorais a partir do óleo essencial obtido de *Marjorana hortensis* Moench, o qual contém 15 % de γ -terpineno na sua composição, sobre as linhagens de leucemia aguda HL-60 e NB4 (ROMEILAH, 2009). Bourgou *et al.* (2010) estudaram a atividade citotóxica de γ -terpineno sobre as linhagens celulares A-549 (carcinoma de pulmão) e DLD-1 (adenocarcinoma de cólon) e obtiveram $\text{IC}_{50} \geq 100$ mM (13,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), para ambas as linhagens de células.

O composto isolado terpinen-4-ol apresentou um efeito citotóxico em células Jurkat comparável ao dos óleos essenciais avaliados. Esse monoterpeneo tem demonstrado potencial antiviral, antibacteriano, antifúngico e inseticida bem como atividades antioxidante e anti-inflamatórias (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010; WEDGE *et al.*, 2009; CHA; JEONG; JEONG, 2007; BARRA *et al.*, 2007; ZÚÑIGA *et al.*, 2005). Esse composto também exibiu efeitos antiproliferativos e antitumorais em linhagens de células de mesotelioma murino (AE17) e melanoma murino (B16) (GREAY *et al.*, 2010). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel e seu componente majoritário, terpinen-4-ol, foram capazes de prejudicar o crescimento de células de melanoma humano (M14) (CALCABRINI *et al.*, 2004). Wu e colaboradores (2012) verificaram que terpinen-4-ol provocou um efeito dose-dependente de citotoxicidade em câncer de pulmão. Apesar dos vários trabalhos sobre o potencial citotóxico de terpinen-4-ol em células de câncer e os resultados obtidos para as células Jurkat, este trabalho apontou baixa citotoxicidade do terpinen-4-ol contra as linhagens celulares J774A.1, B16F10 e HeLa.

A citotoxicidade verificada a partir dos compostos testados não seguiu padrão dose ou tempo dependente. E as diferenças observadas na viabilidade celular para os três períodos de incubação estudados podem estar relacionadas à metabolização e/ou a volatilização de alguns componentes presentes no óleo essencial responsáveis pelo efeito citotóxico ou moduladores dessa atividade.

Considerando todos os resultados anteriores obtidos a partir do ensaio do MTT, o ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul de Tripán, o ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH), a análise de conteúdo de DNA celular e a análise da fragmentação do DNA e ciclo celular foram realizados com as células Jurkat, com o propósito de elucidar o possível mecanismo de citotoxicidade.

A Figura 47 mostra a viabilidade das células Jurkat tratadas com os óleos essenciais e com os terpenos nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada por meio da técnica de exclusão do azul de tripan. O comportamento das células Jurkat frente aos compostos testados nesse ensaio foi bastante semelhante ao verificado para o ensaio de redução do MTT. Para os três períodos de exposição é possível notar que a porcentagem de células viáveis é praticamente nula para a concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os óleos essenciais e o terpinen-4-ol a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveram um decréscimo acentuado na viabilidade celular especialmente para os períodos de exposição de 48 e 72 h.

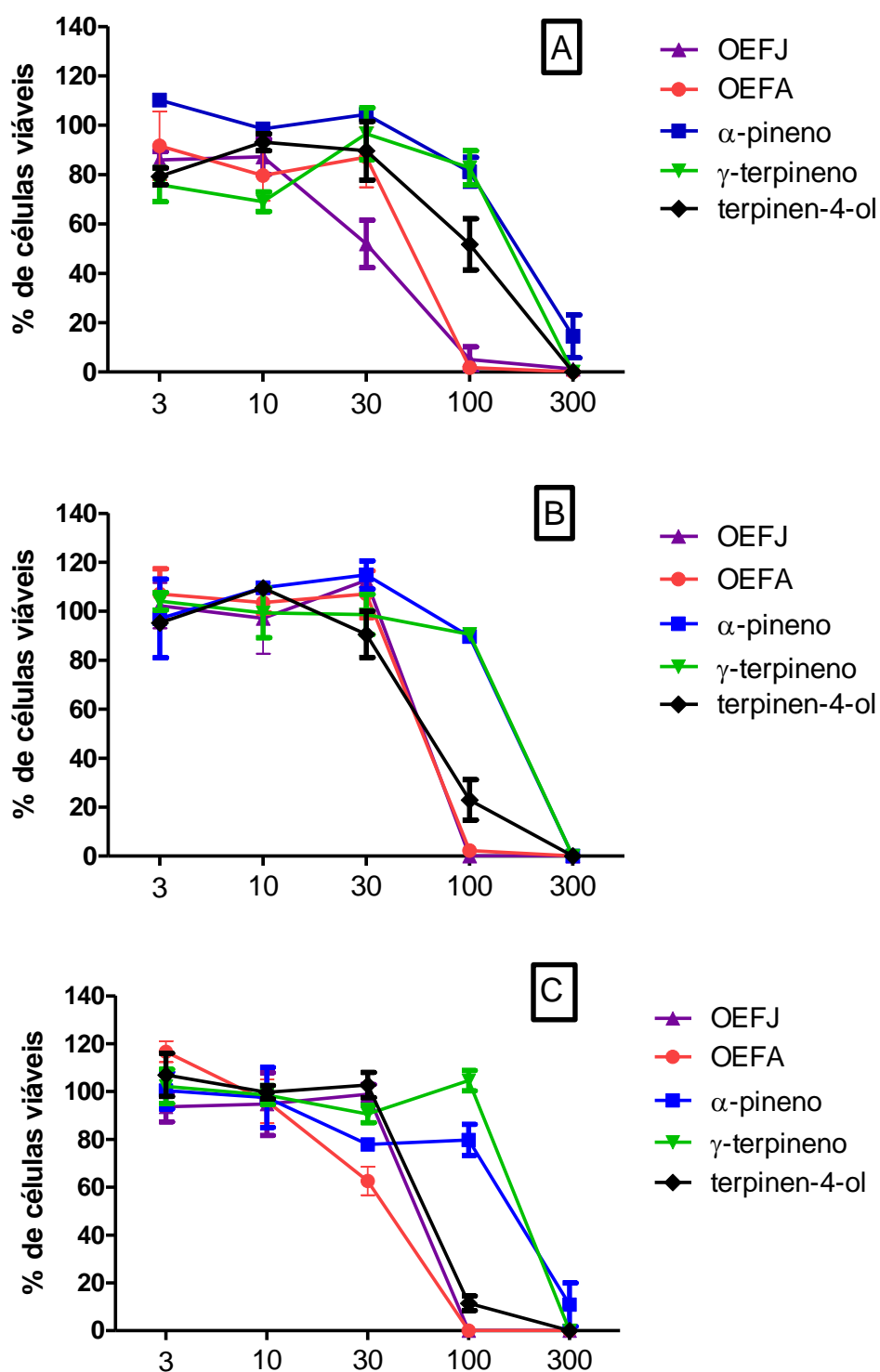


FIGURA 47 – EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS TERPENOS SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT. AS CÉLULAS FORAM TRATADAS PELO PERÍODO DE 24 (A), 48 (B) E 72 H (C) E A VIABILIDADE CELULAR FOI AVALIADA PELA TÉCNICA DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN. AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS (3, 10, 30, 100 E 300) ESTÃO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$. COMO CONTROLE NEGATIVO (CONTROLE) EMPREGOU-SE APENAS O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS AMOSTRAS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5).

NOTA: OEJFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

Apesar do número de células viáveis para as maiores concentrações reduzir ou ser quase nulo (FIGURA 47), poucas células não-viáveis puderam ser observadas na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todos os tratamentos (TABELA 08). Possivelmente, a toxicidade dos óleos essenciais e terpenos conduziu as células Jurkat, ou a morte celular por apoptose levando a formação de corpos apoptóticos ou restos celulares que não coram com azul de Tripán, ou gerou parada do ciclo celular (inibição de proliferação), o que implica na redução do número de células viáveis sem aumento das células não-viáveis.

TABELA 08 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS JURKAT NÃO-VIÁVEIS EVIDENCIADAS PELA TÉCNICA DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN NOS TRATAMENTOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PELOS PERÍODOS DE 24, 48 E 72 H

Amostras	% DE CÉLULAS INVIÁVEIS		
	Concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$		
	24 h	48 h	72 h
OEFJ	$2,56 \pm 2,22$	$2,33 \pm 4,65$	$2,63 \pm 1,24$
OEFA	$1,85 \pm 3,21$	< 1%	$2,34 \pm 2,03$
α-pineno	4,70	$3,33 \pm 1,57$	$3,86 \pm 5,11$
γ-terpineno	$3,45 \pm 4,88$	$4,05 \pm 4,05$	$1,28 \pm 0,91$
terpinen-4-ol	$4,60 \pm 3,98$	$6,08 \pm 2,87$	$2,72 \pm 1,05$

NOTA: Os resultados estão expressos como média \pm DP.

OEFJ= óleo essencial de folhas jovens

OEFA= óleo essencial de folhas adultas

Para descartar possível citotoxicidade por indução de necrose, foi realizado o ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática. Os resultados da Figura 48 mostram a atividade da LDH citoplasmática liberada no meio de cultivo de células Jurkat, tratadas com os óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *E. benthamii* e com os terpenos α -pineno, γ -terpineno e terpinen-4-ol a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pelo período de 4 h. Comparando-se ao meio de cultivo livre de soro (controle negativo), não houve aumento estatisticamente significativo na atividade de LDH liberada pelas células Jurkat. No entanto, todas as amostras mostraram uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) na atividade de LDH liberada, em comparação com 0,1% de Triton X-100[®] (controle positivo).

A enzima intracelular LDH é rapidamente liberada de células danificadas (com perda de integridade de membrana celular) para o sobrenadante da cultura de células. Nesse sentido, células danificadas ou sob estresse liberam LDH citoplasmática e outras substâncias para o meio devido a uma alteração da estrutura da membrana citoplasmática e necrose celular (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983). Por isso, é possível sugerir que a atividade citotóxica do óleo essencial e compostos testados não esteja associada ao mecanismo de morte celular por necrose. Consequentemente, os resultados deste ensaio indicam que a atividade citotóxica das amostras em estudo pode envolver indução de morte celular por apoptose, o que corrobora com o observado na técnica de exclusão com azul de Tripan.

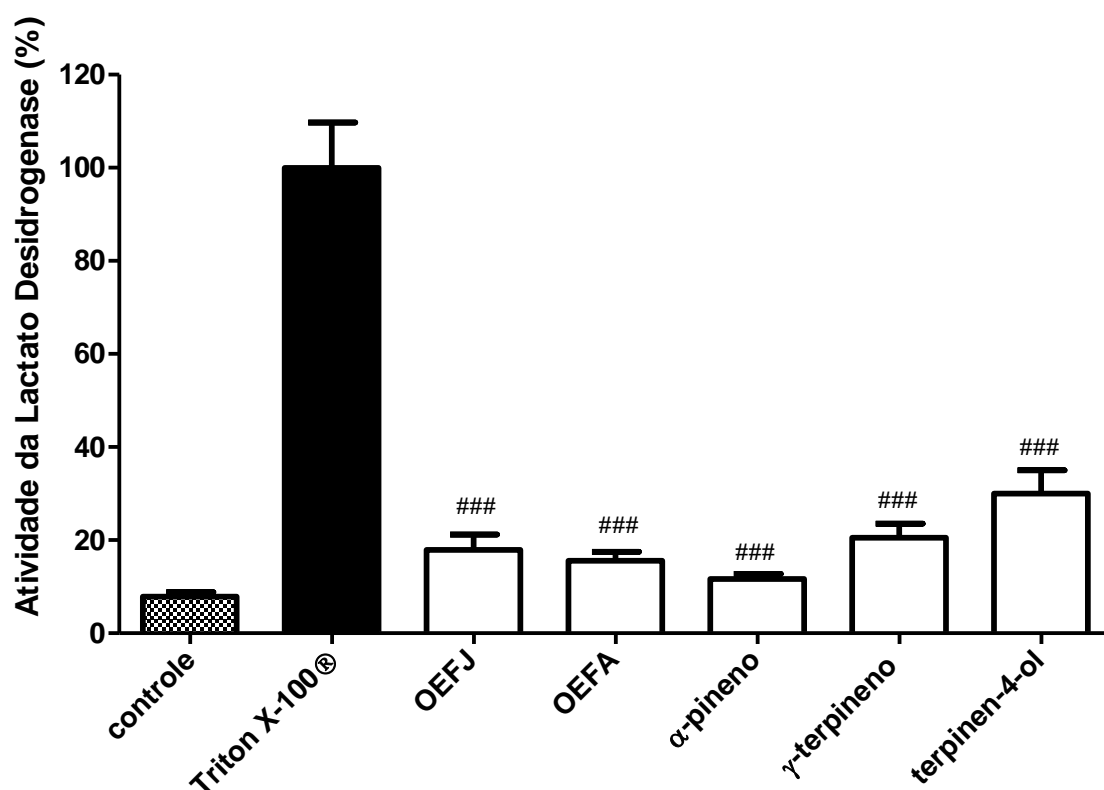


FIGURA 48 – ATIVIDADE DA LDH CITOPLASMÁTICA LIBERADA NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM AS AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PELO PERÍODO DE 4 H. NO CONTROLE POSITIVO AS CÉLULAS FORAM TRATADAS COM TRITON X-100®. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE POST-HOC DE TUKEY. ### P<0.001 QUANDO COMPARADO AO CONTROLE POSITIVO (TRITON X-100®).

NOTA: OEFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

O efeito dos óleos essenciais e terpenos sobre a proliferação de células Jurkat por meio da análise de conteúdo de DNA está indicado nas Figuras 49, 50 e 51. Quando empregou-se o tratamento com as amostras na concentração de $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve diminuição no conteúdo de DNA apenas para as células Jurkat tratadas com os óleos essenciais. Na concentração de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, todas as amostras, com exceção do monoterpene α -pineno, conduziram a uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no conteúdo de DNA em comparação com o controle (meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% SFB). Já na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, todas as amostras reduziram significativamente ($P < 0,001$) o conteúdo de DNA, em comparação com o controle. Além disso, os óleos essenciais das folhas jovens e adultas de *E. benthamii* a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ também demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa no conteúdo de DNA, em comparação com

o controle positivo (vincristina a 40 nmol.L^{-1}). A análise do conteúdo de DNA das células estudadas revela que os compostos testados, principalmente o óleo volátil de *E. benthamii*, poderiam inibir a proliferação de células tumorais.

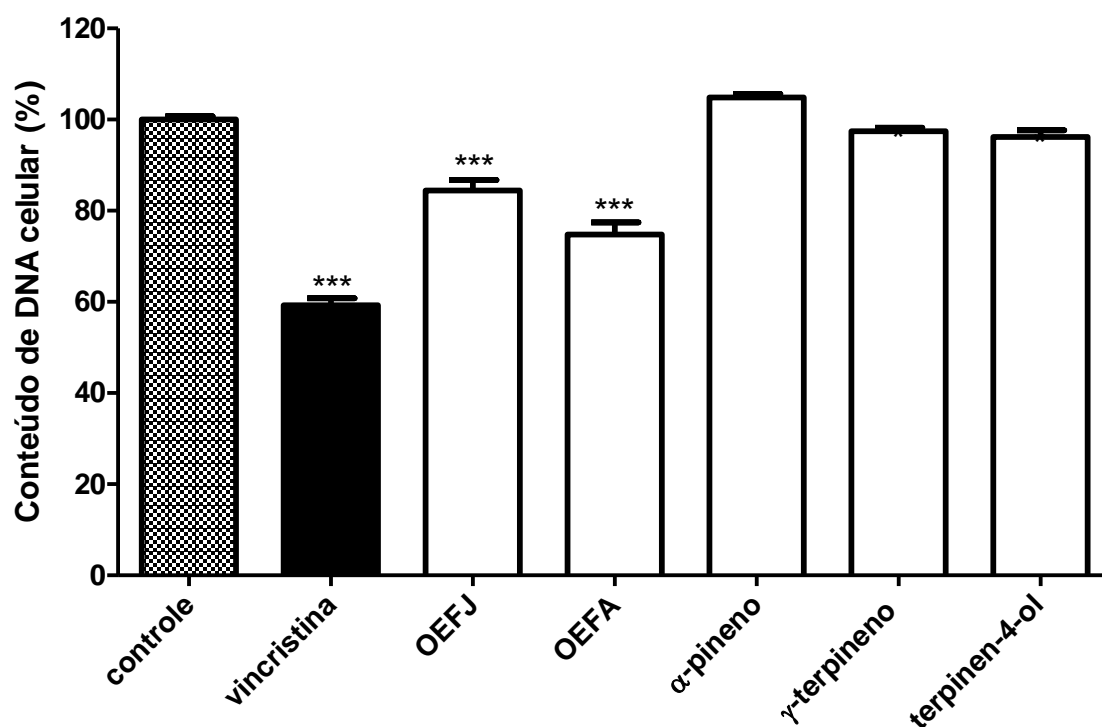


FIGURA 49 – CONTEÚDO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE.

NOTA: OEFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

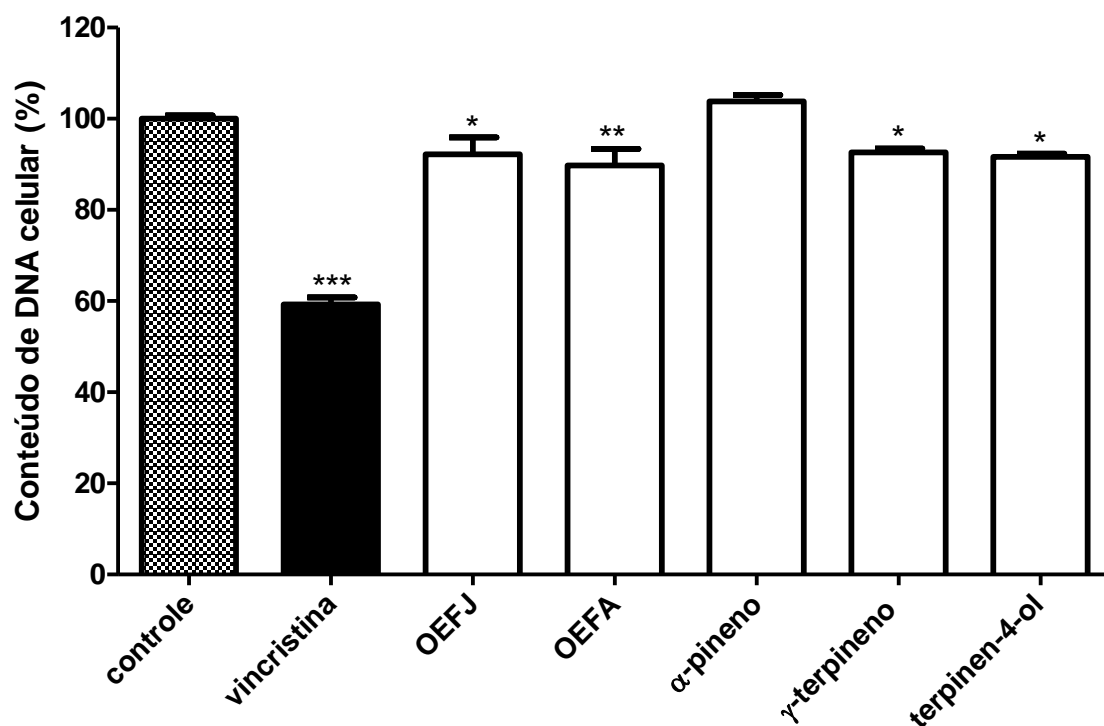


FIGURA 50 – CONTEÚDO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADOS AO CONTROLE.

NOTA: OEFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

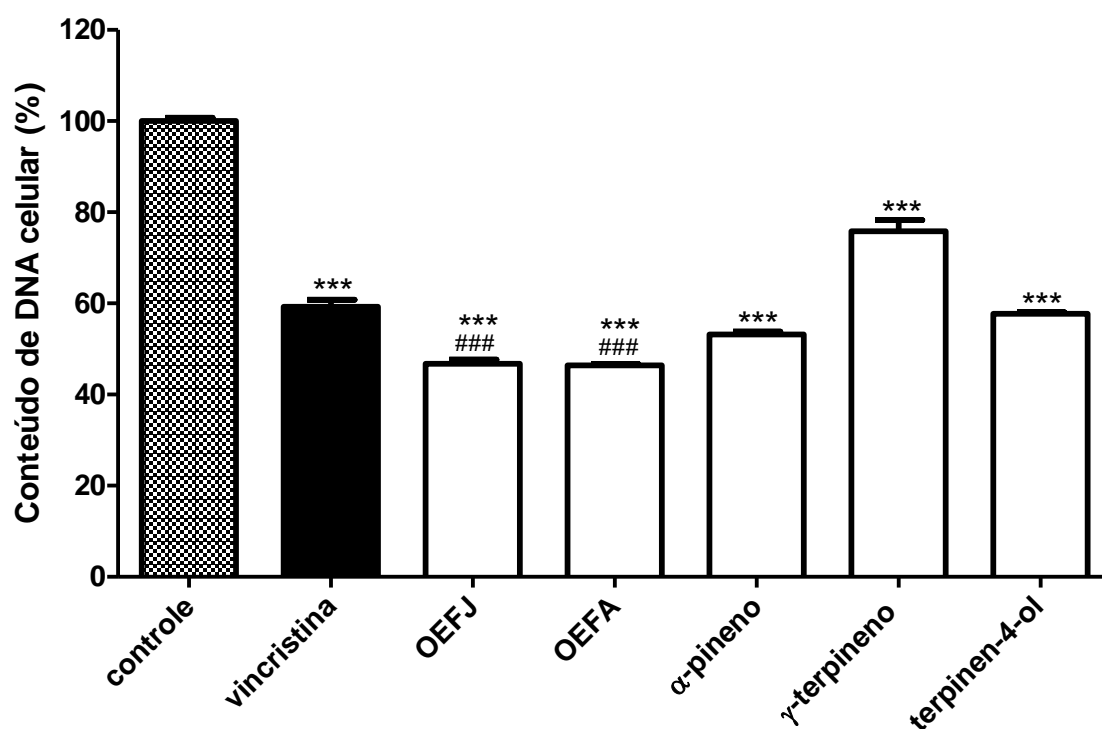


FIGURA 51 – CONTEÚDO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS E TERPENOS NA CONCENTRAÇÃO DE $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 3-5). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. ### $P < 0.001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE POSITIVO (VINCRISTINA A 40 nmol.L^{-1}) E *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE.

NOTA: OEFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

Nesse sentido, após a verificação do conteúdo de DNA celular, foi examinado se os óleos essenciais e terpenos poderiam induzir fragmentação do DNA ou gerar parada de ciclo celular, o que explicaria a redução da proliferação das células Jurkat. Para tanto, utilizou-se citometria de fluxo e o emprego do fluoróforo iodeto de propídio. Para essa avaliação, somente os compostos que demonstraram maior diminuição na viabilidade celular no ensaio do MTT foram testadas.

Cumprе ressaltar que o citômetro de fluxo produz uma coluna de células em suspensão que passa por uma fonte luminosa (laser monocromático – 488 nm) para a excitação do fluoróforo utilizado (iodeto de propídeo). O aparelho contém detectores para a luz emitida por esse composto o que permite quantificá-la, além de detectores de luz refletida, de modo a ser possível avaliar o diâmetro e a granulosidade celular. Os resultados da análise por citometria de fluxo podem ser expressos de diversas formas, conforme a combinação das variáveis estudadas. Uma possibilidade é por meio de gráficos de dispersão, compostos no eixo das

ordenadas por uma medida de dispersão de luz que reflete a granulosidade e no eixo das abcissas por uma medida de volume celular que representa o diâmetro da célula (VERMES *et al.* 2000). Células com DNA fragmentado apresentam volume reduzido e aumento de granulosidade. Outra maneira de analisar os resultados é por meio de histograma, que no eixo das ordenadas apresenta a porcentagem de células para um determinado grau de fluorescência e, no eixo das abcissas, a quantidade de fluorescência emitida pela célula.

O fluoróforo iodeto de propídeo é muito utilizado tendo em vista que se intercala com o DNA das células e é o responsável pela emissão da fluorescência, índice de conteúdo de DNA (VERMES *et al.* 2000). Numa população normal de células em proliferação, grande parte dessas contém quantidade de DNA correspondente a um número $2n$ de cromossomo (46 para humanos, células nas fases G0-G1 do ciclo celular), conforme indicadas em histogramas. Essas populações estão representadas em histogramas no eixo das abcissas (fluorescência) com seu pico próximo a 10^3 . Entre esses picos estão as células que estão duplicando seu DNA (fase S). A população de células à esquerda de G0-G1 apresenta DNA fragmentado, pois contém menos de $2n$ cromossomos.

Nas Figuras 52 a 54 estão apresentados alguns histogramas obtidos nos experimentos.

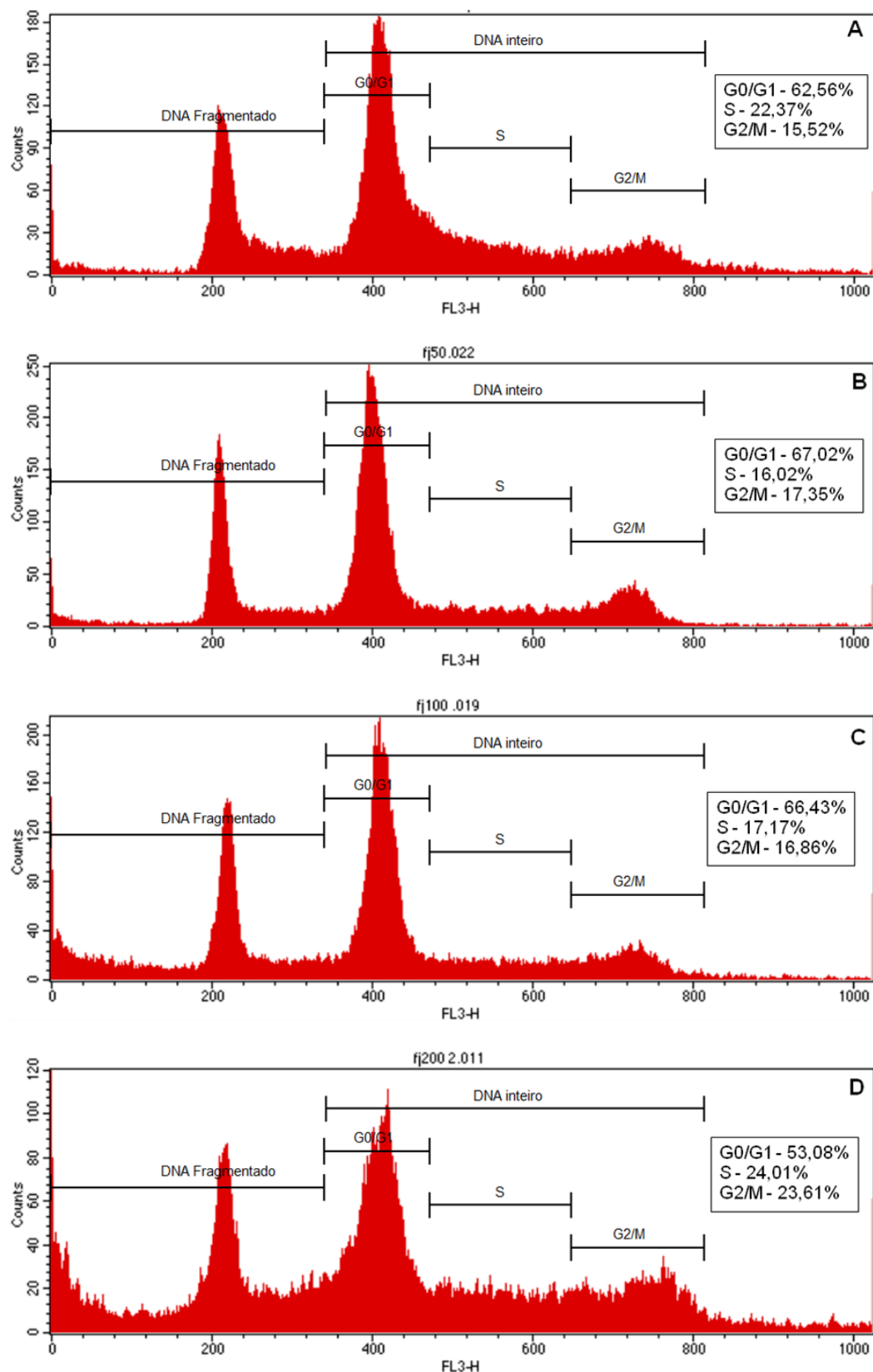


FIGURA 52 – ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS JURKAT DO GRUPO CONTROLE (A) E DOS GRUPOS TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS DE *E. benthamii* A 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) E 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). ESSA FIGURA É REPRESENTATIVA DE COMO FORAM OBTIDOS E ANALISADOS OS RESULTADOS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR.

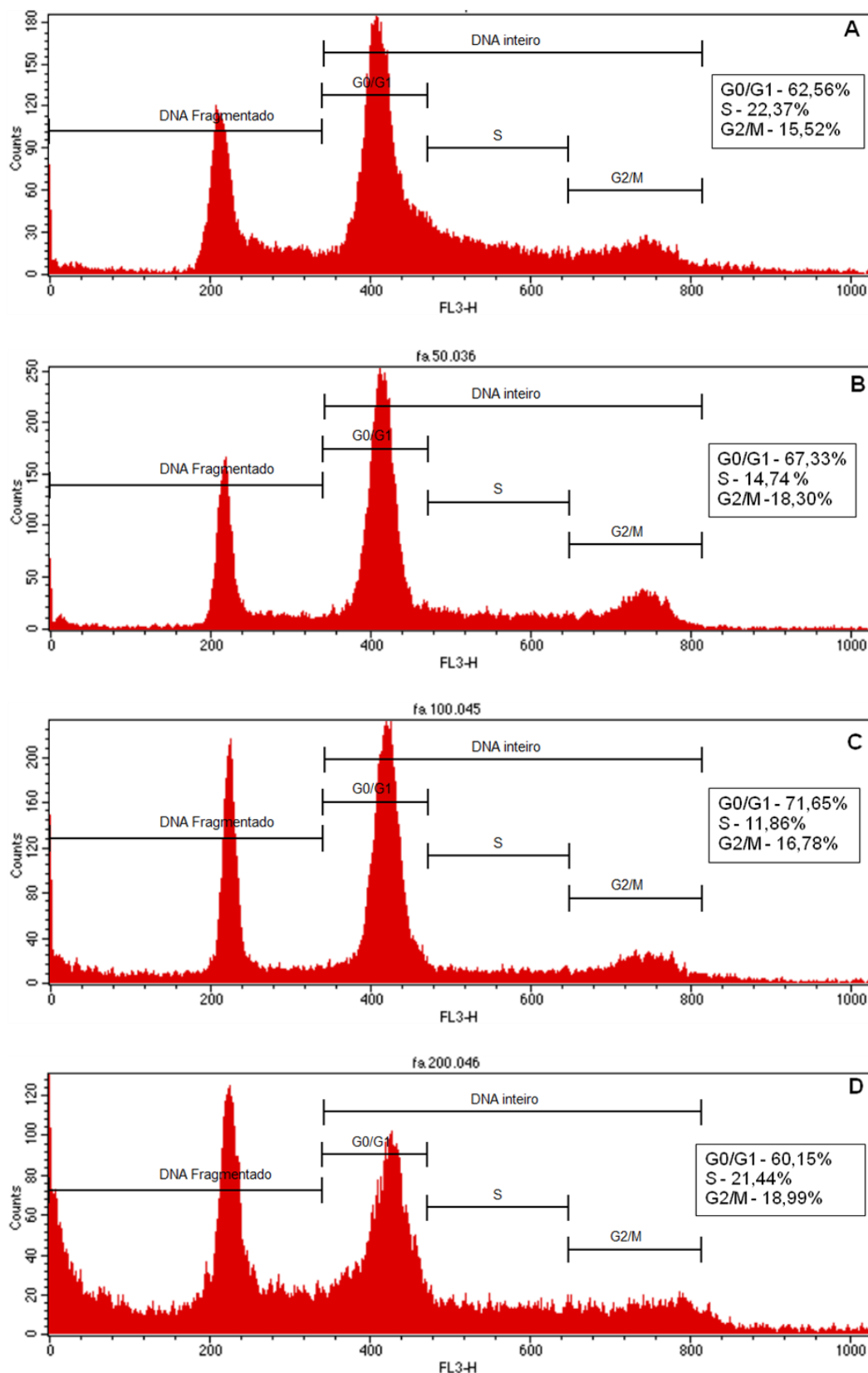


FIGURA 53 – ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS JURKAT DO GRUPO CONTROLE (A) E DOS GRUPOS TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS ADULTAS DE *E. benthamii* A 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) E 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). ESSA FIGURA É REPRESENTATIVA DE COMO FORAM OBTIDOS E ANALISADOS OS RESULTADOS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR.

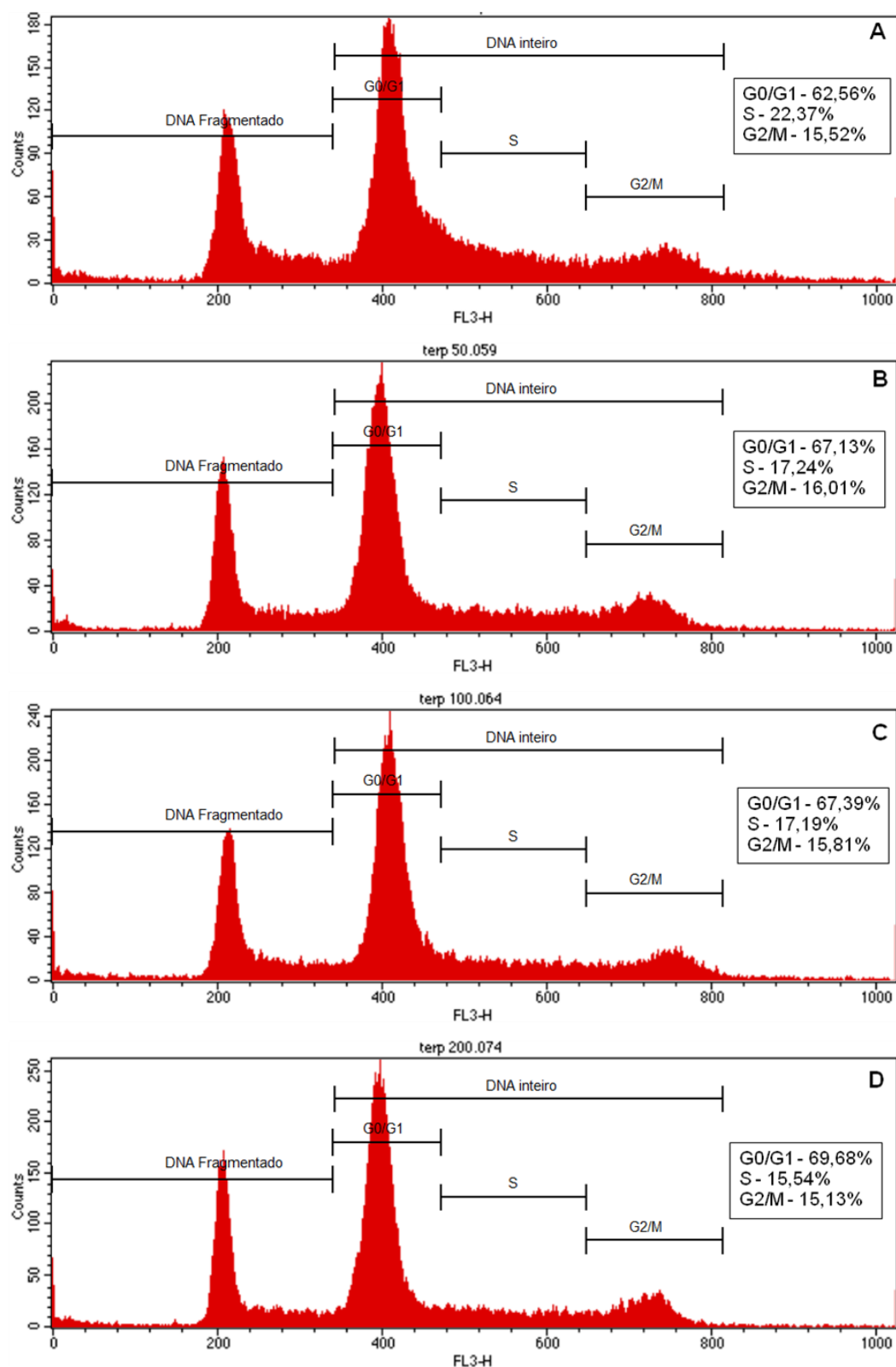


FIGURA 54 – ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS JURKAT DO GRUPO CONTROLE (A) E DOS GRUPOS TRATADOS COM O TERPINEN-4-OL A 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) E 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). ESSA FIGURA É REPRESENTATIVA DE COMO FORAM OBTIDOS E ANALISADOS OS RESULTADOS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR.

As células tratadas com o óleo essencial das folhas jovens e adultas nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram uma maior fragmentação do DNA que diferiu significativamente das células sem tratamento (controle) (FIGURA 55). O óleo essencial das folhas adultas a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveu o maior aumento no número de células fragmentadas gerando um acréscimo de 23% na fragmentação de DNA em relação ao controle.

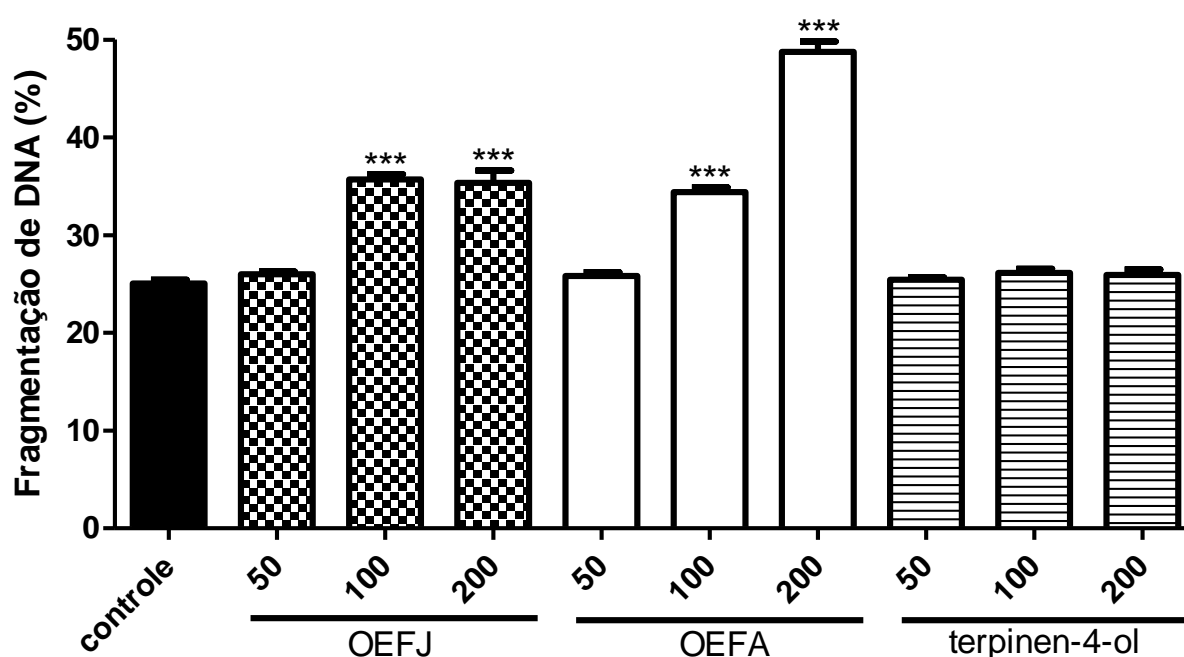


FIGURA 55 – FRAGMENTAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE *E. benthamii* E TERPINEN-4-OL NAS CONCENTRAÇÕES DE 50, 100 E 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PELO PERÍODO DE 24 H. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EPM (N= 4). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY. *** $P < 0,001$ QUANDO COMPARADO AO CONTROLE.

NOTA: OEFJ= óleo essencial de folhas jovens
OEFA= óleo essencial de folhas adultas

Os resultados da análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo estão expressos em porcentagem da média de células nas diferentes fases do ciclo celular, ou seja, fase quiescente G0/G1, fase S (síntese) e fase G2/M (Mitose) (TABELA 09).

As células da linhagem Jurkat quando tratadas com os óleos essenciais a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram significativo aumento na população de células na fase G0/G1 e decréscimo no número de células na fase S. Todavia quando essas foram tratadas com os óleos essenciais a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ houve significativa diminuição na população de células na fase G0/G1 e aumento no número de células na fase S. O constituinte monoterpênico terpinen-4-ol não alterou significativamente a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular quando comparado ao controle.

TABELA 09 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS JURKAT TRATADAS COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. benthami* E TERPINEN-4-OL NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR, G0/G1, S E G2/M.

AMOSTRAS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% DE CÉLULAS NAS FASES DO CICLO CELULAR		
	G0/G1	S	G2/M
Controle	$64,81 \pm 2,40^a$	$18,52 \pm 1,95^b$	$17,08 \pm 2,02^c$
OEJF	50 $66,24 \pm 1,04$	$16,53 \pm 1,06^{*b}$	$17,56 \pm 0,90$
	100 $68,64 \pm 1,43^{*a}$	$15,33 \pm 1,04^{***b}$	$16,48 \pm 0,73$
	200 $55,62 \pm 2,76^{***a}$	$23,09 \pm 0,71^{***b}$	$21,94 \pm 2,05^{***c}$
OEFA	50 $67,41 \pm 0,65$	$14,84 \pm 0,41^{***b}$	$18,10 \pm 0,49$
	100 $71,35 \pm 0,79^{***a}$	$12,21 \pm 0,42^{***b}$	$16,80 \pm 0,72$
	200 $60,72 \pm 0,60^{**a}$	$22,23 \pm 0,56^{***b}$	$17,84 \pm 0,82$
Terpinen-4-ol	50 $66,67 \pm 1,43$	$16,96 \pm 1,17$	$16,77 \pm 0,58$
	100 $66,97 \pm 1,04$	$17,08 \pm 0,38$	$16,29 \pm 0,93$
	200 $67,64 \pm 1,90$	$16,19 \pm 0,83$	$16,55 \pm 1,33$

NOTA: Os resultados estão expressos como média \pm EPM, n= 4. * indica quais grupos obtiveram diferença significativa em relação ao controle, definidos pela análise de variância Anova e pelo teste *post-hoc* de Tukey, onde * $P < 0,5$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. OEJF= óleo essencial de folhas jovens e OEFA= óleo essencial de folhas adultas.

Como mencionado anteriormente, diversas investigações têm demonstrado que os óleos voláteis apresentam atividade supressiva contra o câncer tanto *in vitro* quanto *in vivo*, quando testados em linhagens de células humanas de câncer (DE SOUSA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004; CALCABRINI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2001; BUHAGIAR *et al.*, 1999). Em especial, os terpenos, tem despertado a atenção da comunidade científica para seus efeitos sobre células tumorais. Algumas investigações os têm considerado inibidores da sinalização de NF- κ B com potencial anti-inflamatório e antitumoral (DUBEY *et al.*, 1997; MOTEKI *et al.*, 2002; CLARCK *et al.*, 2006; OLIVEIRA 2010).

Os resultados demonstrados nesse trabalho deixam evidente a susceptibilidade particular das células Jurkat a essa classe de compostos. Considerando que as células Jurkat são uma linhagem tumoral leucêmica, pode-se pensar que possa existir uma especificidade dos terpenos por este tipo celular. Existem alguns estudos envolvendo o efeito destes compostos sobre células leucêmicas, porém não há relatos concernentes a especificidade de terpenos a algum tipo de célula tumoral.

O álcool perílico é um monoterpeno monocíclico hidroxilado que possui atividade quimiopreventiva e quimioterápica para diversos tipos de tumores malignos (OLIVEIRA, 2010). Clark e colaboradores (2002) verificaram que esse terpeno bloqueia o ciclo celular em células leucêmicas. Também foi constatado que o álcool perílico induz apoptose em células leucêmicas (CLARCK *et al.*, 2006). As células da linhagem K562 de leucemia mielóide crônica foram suscetíveis à ação do álcool perílico e seu metabólito, ácido perílico. O monoterpeno citral apresentou atividade citotóxica contra células leucêmicas P-388 de camundongos (DUBEY *et al.*, 1997). O ácido ursólico, composto terpênico isolado do extrato de *Hyptis capitata* Jacq., exibiu citotoxicidade significativa em células linfocíticas leucêmicas P-388 e L-1210 (LEE *et al.*, 1988). O 1,8-cineol, monoterpeno isolado da espécie *Laurus nobilis* L., promoveu apoptose de células leucêmicas *in vitro* (MOTEKI *et al.*, 2002). Porém, ainda não há nada conclusivo na literatura.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade, viabilidade e proliferação celular realizados com as células Jurkat, sugerem que a atividade citotóxica dos óleos essenciais quando utilizados em altas concentrações pode envolver indução de morte celular por apoptose, conforme observado pelo aumento de fragmentação de DNA. Apesar da literatura mencionar que a citotoxicidade de óleos essenciais pode

estar relacionada ao dano de membrana, nenhum resultado observado nesse estudo é indicativo de que os terpenos e óleos essenciais de *E. benthamii* afetam a integridade da membrana.

Interessante é ainda o achado de que os óleos essenciais podem, em concentrações menores ($50 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), gerar parada de ciclo celular em G0/G1 (TABELA 09). Tal resultado merece maiores investigações.

Assim, considerando o pequeno número de investigações sobre o efeito citotóxico/antiproliferativo de *Eucalyptus* spp. em células tumorais, este estudo apontou que os óleos essenciais das folhas jovens e adultas de *E. benthamii* apresentam citotoxicidade principalmente contra as linhagens células Jurkat, HeLa e B16F10, em comparação com o terpenos isolados, particularmente α -pineno e γ -terpineno.

Os resultados obtidos demonstram também a importância do *E. benthamii* como fonte alternativa de uma mistura complexa de compostos voláteis que podem ser usados como agentes citotóxicos. Além disso, experimentos futuros devem continuar com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação desses compostos e uma possível especificidade em relação a células leucêmicas. Outras pesquisas envolvendo a modelagem química de moléculas de monoterpenos também podem contribuir na busca por fármacos mais eficientes para o tratamento do câncer.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- Por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, *E. benthamii* apresenta um óleo essencial com composição química diferenciada, visto que não contém 1,8-cineol ou apresenta somente traços desse componente monoterpênico, além de uma concentração relativamente elevada de α -pineno;
- As análises multivariadas PCA e HCA revelam similaridade entre as composições voláteis obtidas a partir de folhas jovens e adultas coletadas durante o verão e menor semelhança da amostra do outono com as demais amostras;
- O maior percentual de α -pineno está presente no óleo essencial obtido a partir das folhas adultas da coleta de outono (38,63%);
- O óleo volátil de folhas adultas da espécie em estudo possui efeito anti-inflamatório, verificado pela redução do edema e da infiltração leucocitária. O α -pineno reflete a atividade anti-inflamatória do óleo essencial, porém a influência dos demais constituintes presentes na essência modula a atividade do composto majoritário, determinando resultados diferentes para a mesma avaliação biológica;
- Embora o óleo essencial de folhas adultas de *E. benthamii* tenha apresentado potencial para inibir a produção de óxido nítrico, seu composto majoritário, α -pineno, não demonstrou o mesmo efeito sobre os macrófagos peritoneais de camundongos. Dessa forma, é possível sugerir que o óleo essencial da espécie *E. benthamii* possui constituintes voláteis que podem atuar como agente imunomodulador;
- Considerando a atividade citotóxica sobre as quatro linhagens tumorais estudadas com base no ensaio do MTT, os óleos essenciais demonstram melhores resultados que o α -pineno e o γ -terpineno, particularmente para as células Jurkat, HeLa e B16F10. O terpinen-4-ol mostrou um efeito citotóxico contra células Jurkat comparável ao dos óleos essenciais avaliados.

- Os resultados dos ensaios de exclusão do azul de Tripán, liberação de lactato desidrogenase (LDH), conteúdo de DNA celular e fragmentação de DNA celular realizados com as células Jurkat, indicam que as amostras em estudo podem conduzir a um processo de morte celular por apoptose.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; SALEHNIA, A.; MORTAZAVI, S.; EBRAHIMI, M.; SHAFIEE, A.; FOULADIAN, F.; KESHAVARZ, K.; SOROURI, S.; KHORASANIB, R.; KAZEMI, A. Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja Khuzestanica* in rat *in vivo*: a toxicopharmacological study. **Medical Science Monitor**, v. 9, p. 331–335, 2003.
- AL-FATIMI, M.; FRIEDRICH, U.; JENETT-SIEMS, K. Cytotoxicity of plants used in traditional medicine in Yemen. **Fitoterapia**, v. 76, p. 355–358, 2005.
- ALI, B.; BLUNDEN, G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 299–305, 2003.
- ALMEIDA, L. P.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; SANTIAGO, M. F. Biotransformação do 1,8-cineol por bactérias livres e imobilizadas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2005.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998.
- ANDRADE, E. N.; VECCHI, O. **Os Eucaliptos**: sua cultura e exploração. São Paulo: Typographia Brazil de Rothschild ; Comp., 1918, 225 p.
- ANTONIO, R. D. **Caracterização fitoquímica, morfoanatomia e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA ABRAF 2011: ano base 2010. Brasília: ABRAF 2011. 130 p.
- AQIL, M.; AHAD, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23/24, 2007.
- ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 4-9, 2003.
- ASHOUR, H. M. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 399–403, 2008.
- ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 673–679, 2010.

AUDINO, P. G.; VASSENA, C.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. Effectiveness of lotions based on essential oils from aromatic plants against permethrin resistant *Pediculus humanus capitis*. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, p. 389-392, 2007.

AYEPOLA, O. O.; ADENIYI, B. A. The Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, n. 11, p. 1410-1413, 2008.

BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 226-231, 2009.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; CHIAVARINI, M.; IMPICCIATORE, M.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; BAROCELLI, E. Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon 'grosso'. **Phytomedicine**, v. 11, p. 596-601, 2004.

BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P.; ANGIONI, A. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7093-7098, 2007.

BARTON, A. F. M.; TJANDRA, J.; NICHOLAS, P. G. Chemical evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1253-1257, 1989.

BASILE, A.; SENATORE, F.; GARGANO, R.; SORBO, S.; DEL PEZZO, M.; LAVITOLA, A.; RITIENI, A.; BRUNO, M.; SPATUZZI, D.; RIGANO, D.; VUOTTO, M. L.. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italic* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 240-248, 2006.

BENSON, D. A. Aspects of the ecology of a rare tree species, *Eucalyptus benthamii*, at Bents Basin, Wallacia. **Cunninghamia**, v. 1, n. 3, p. 371-383, 1985.

BENSON, D.; McDOUGALL, L. Ecology of Sydney plant species: part 6 dicotyledon family Myrtaceae. **Cunninghamia**, Sydney, v. 5, n. 4, p. 809-987, 1998.

BENYAHIA, S.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; LEÓN, F.; QUINTANA, J.; LÓPEZ, M.; HERNÁNDEZ, J. C.; ESTÉVEZ, F.; BERMEJO, J. Cladocalol, a pentacyclic 28-nortriterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 627-632, 2005.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BERTEA, C. M.; FREIJE, J. R.; VAN DER WOUDE, H.; VERSTAPPEN, F. W. A.; PERK, L.; MARQUEZ, V.; DE KRAKER, J.-W.; POSTHUMUS, M. A.; JANSSEN, B. J.

M.; DE GROOT, A.; FRANSSEN, M. C. R.; BOUWMEESTER, H. J. Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. **Planta Medica**, v. 71, p. 40–47, 2005.

BIRUSS, B.; KÄHLIG, H.; VALENTA, C. Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 142–151, 2007.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage – Myrtaceae**. Curitiba, 2009, 139 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BOURGOU, S.; PICHETTE, A.; MARZOUK, B.; LEGAULT, J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 210–216, 2010.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRATTSTEN, L.B. Cytochrome P-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores. In: DUNKEL, F.V. ; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. *vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. **European Academy of Dermatology**, v. 17, p. 663-669, 2003.

BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Curitiba, 2008, 129 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná.

BROOKER, I. Botany of the eucalypts. In: COOPER, J. J. W. ***Eucalyptus*: The Genus *Eucalyptus***. London: Taylor ; Francis, 2002, p. 3-35.

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field Guide to *Eucalyptus***. 3.ed. Melbourne: Bloomings, 2006.

BROPHY, J. J.; SOUTHWELL, I. A. *Eucalyptus* chemistry. In: COOPER, J. J. W. ***Eucalyptus*: The Genus *Eucalyptus***. London: Taylor ; Francis, 2002, p. 102-160.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ L.; JAGER, W.; PLANK, C.; DIETRICH, H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 660-664, 1993.

BUHAGIAR, J.; PODESTA, M.; WILSON, A.; MICALLEF, M.; ALI, S. The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulate*. **Anticancer Research**, v. 19, p. 5435–5443, 1999.

BURFIELD, T.; REEKIE, S. L. Mosquitoes, malaria and essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 30–41, 2005.

BUTCHER, P. A.; SKINNER, A. K.; GARDINER, C. A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, v. 6, n. 2, p. 213-226, 2005.

BUTTERFIELD, D.; LAUDERBACK, C. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 1050–1060, 2002.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medica**, v. 72, p. 311–316, 2006.

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TOCCACIELI, L.; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; SALVATORE, G.; MONDELLO, F.; ARANCIA, G.; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 349–360, 2004.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONÇALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSÉ, F.; POUPON, M. F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Letters**, v. 215, p. 53– 59, 2004.

CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONCALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1333–1338, 2006.

CAVALIERI, E.; MARIOTTO, S.; FABRIZI, C.; PRATI, A. C.; GOTTARDO, R.; LEONE, S.; BERRA, L. G.; LAURO, G. M.; CIAMPA, A. R.; SUZUKI, H. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, p. 589–594, 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

- CERMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of *Eucalyptus* essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology**, v. 56, p. 89-92, 2008.
- CHA, J. D.; JEONG, M. R.; JEONG, S. I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 295–299, 2007.
- CHAO, L. K.; HUA, K.-F.; HSU, H.-Y.; CHENG, S.-S.; LIU, J.-Y.; CHANG, S.-T. Study of the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7274-7278, 2005.
- CHAPPELL, J.; WOLF, F.; PROULX, J.; CUELLAR, R.; SAUNDERS, C. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? **Plant Physiology**, v. 109, p. 1337–1343, 1995.
- CHENG, J.; CHANG, G.; WU, W. A controlled clinical study between hepatic arterial infusion with embolized *Curcuma* aromatic oil and chemical drugs in treating primary liver cancer. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 21, p. 165–167, 2001.
- CHENG, S. S.; HUANG, C. G.; CHEN, Y. J.; YU, J. J.; CHEN, W. J.; CHANG, S. T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 452-256, 2009.
- CLARK, S. S. Perillyl Alcohol Induces c-Myc-Dependent Apoptosis in Bcr/Abl-Transformed Leukemia Cells. **Oncology**, v. 70, p. 13–18, 2006.
- _____; PERMAN, S.M.; SAHIN, M.B.; JENKINS, G.; ELEGBEDE, J.A. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/ G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl transformed cells is to induce growth arrest. **Leukemia**, v. 16, p. 213–222, 2002.
- COMMONWEALTH OF AUSTRALIA. **Forest trees of Australia**. 2^a ed. Canberra: Commonwealth Government Printer, 1962, 230 p.
- COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.
- COUTINHO, J. L. B.; SANTOS, V. F.; FERREIRA, R. L. C.; NASCIMENTO, J. C. B. Avaliação do comportamento de espécies de *Eucalyptus* spp. na zona da mata pernambucana. I: resultados do primeiro ano – 2001. **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 771-775, 2004.
- CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York.

CROTEAU, R. **Function of secondary metabolites in plants** v. 40, p. 115-117, 2000.

CRUZ, A. V. M; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DALEY, J. Head Lice. **The Journal of Complementary Medicine**, p. 22-29, jan/fev, 2007.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n.1-2, p.29-33, 1994.

DEFAVERI, A. C. A.; SATO, A.; BORRÉ, L. B.; AGUIAR, D. L. M.; GIL, R. A. S.; ARRUDA, R. C. O.; RIEHL, C. A. S. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1531-1538, 2011.

DE SOUSA, A.; ALVIANO, D.; BLANK, A.; ALVES, P.; ALVIANO, C.; GATTASS, C. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 677–681, 2004.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**. v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DEWICK, P. M.. **Medicinal Natural Products**. 2.ed. Londres: John Wiley & Son LTD, 2001.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reative oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DIXON, R. A. Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. **Phytochemistry**, v. 57, p. 145-148, 2001.

DUBEY, N. K.; TAKEDA, K.; ITOKAWA, H. Citral: a cytotoxic principle isolated from the essential oil of *Cymbopogon citratus* against P388 leukemia cells. **Current Science**, v. 73, n. 1, p. 22-24, 1997.

DUSCHATZKY, C. B.; POSSETTO, M. L.; TALARICO, L. B.; GARCIA, C. C.; MICHIS, F.; ALMEIDA, N. V.; DE LAMPASONA, M. P.; SCHUFF, C.; DAMONTE, E. B. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 16, p. 247– 251, 2005.

EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n.12, p. 1401-1426, 2004.

ELAISSI, A.; SALAH, K. H.; MABROUK, S.; LARBI, K. M.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1427–1434, 2011.

ELDRIDGE, K. G.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford University Press, 1994.

ELSON, C. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1666S–1672S, 1995.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and antiinflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2002.

FABROWSKI, F.J.. ***Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002, 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná.

FANG, J.; LEU, Y.; HWANG, T.; CHENG, H. Essential oils from Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) as novel enhancers to accelerate transdermal drug delivery. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1819–1825, 2004.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; HONG, H.; STUEHR, D. J. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 491-496, 1993.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**: construindo a história dos produtos naturais, nº 7, 2006.

FRANCO, J. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. Ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 191-194, 2005.

FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z.G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2690–2694, 1997.

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

_____; Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**. New Jersey: Humana Press, p.129-131, 2003.

GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 39713-39720, 2001.

GILLIS, S.; WATSON, J. Biochemical and biological characterization of lymphocytes regulatory molecules. V-identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 1709-1719, 1980.

GLASS, C.K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GRAS, E. K.; READ, J.; MACH, C. T.; SANSON, G. D.; CLISSOLD, F. J. Herbivore damage, resource richness and putative defences in juvenile versus adult *Eucalyptus* leaves. **Australian Journal of Botany**, v. 53, p. 33–44, 2005.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; SPITZENBERGER, R.; ELSTNER, F. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and betacarotene effectively prevents oxidation of LDL. **Phytomedicine**, v. 12, p. 416–423, 2005.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; VOLLMANN, R., ELSTNER, E. Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7576–7582, 2003.

GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Antihyperglycemic actions of *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus*) are associated with pancreatic and extrapancreatic effects in mice. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2319–2323, 1998.

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 39, p. 135-138, 1999.

GREAY, S. J.; IRELAND, D. J.; KISSICK, H. T.; LEVY, A.; BEILHARZ, M. W.; RILEY, T. V.; CARSON, D. F. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 877–888, 2010.

GRESSLER, E; PIZO M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUANG, L.; LI-BIN, Z.; BING-AN, F.; MING-YANG, Q.; LI-HUA, Y.; JI-HONG, X. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by *d*-limonene. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, p. 2140–2144, 2004.

GUEDES, D.; SILVA, D.; BARBOSA-FILHO, J.; DE MEDEIROS, I. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomedicine**, v. 1, p. 490–497, 2004.

GUENTHER, E. **In The Essential Oil**, vol. IV, New York: D.Van Nostrand, 1950.

GUENTHER, E. Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. In: **The Essential Oils**, 4.ed. New York: Van Nostrand, 1977. v.4.

GUYTON, K.; KENSLER, T. Prevention of liver cancer. **Current Oncology Reports**, v. 4, p. 464–470, 2002.

HAJHASHEMI, V.; SAJJADI, S. E.; HESHMATI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 475–480, 2009.

HAMID, A. A.; AIYELAAGBE, O. O.; USMAN, L. A. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. **International Journal of Current Research**, v. 33, n. 2, p. 86-98, 2011.

HAUDENSCHILD, C.; CROTEAU, R. Molecular engineering of monoterpene production. **Genetic Engineering**, v. 20, p. 267–280, 1998.

HE, C.; MURRAY, F.; LYONS, T. Seasonal variations in monoterpene emissions from *Eucalyptus* species. **Chemosphere: Global Change Science**, v. 2, p. 65-76, 2000.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters: the irritants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 31, p. 377-467, 1974.

HENDERSON, C.; SMITH, A.; URE, J.; BROWN, K.; BACON, E.; WOLF, C. Increased skin tumorigenesis in mice lacking π -class glutathione S-transferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 5275–5280, 1998.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.

Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia, 1ª ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007. 303 p.

HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 38, p. 121-123, 1999.

_____; CARVALHO, P. E. R. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura/Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, v. 3, p. 459-462, 1990.

_____; PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Comunicado Técnico 100, Embrapa Florestas, 2003.

HOET, S.; STE´VIGNY, C.; HE´RENT, M.F.; QUETIN-LECLERCQ, J.. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, v. 72, p. 480–482, 2006.

HOSSAIN, S.; AOSHIMA, H.; KODA, H.; KISO, Y. Fragrances in oolong tea that enhance the response of GABAA receptors. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, p. 1842–1848, 2004.

INTERAMINENSE L. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves and its main constituent, eugenol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Planta Medica**, v. 71, n. 4, p. 376-378, 2005.

IPEK, E.; ZEYTINOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B. A.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chemistry**, v. 93, p. 551–556, 2005.

ISMAN, M. Pesticides based on plant essential oils. **Pestic Outlook** v. 10 p. 68-72, 1999.

ITO, H.; KOREISHI, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; YOSHIDA, T. J. Cypellocarpins A-C, phenol glycosides esterified with oleuropeic acid, from *Eucalyptus cypellocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 9, P. 1253-1257, 2000.

JIRI, R.; PARIJA, T.; DAS, B. d-Limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. **Oncology Reports**, v. 6, p. 1123–1127, 1999.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1966.

JOVANOVIC, T.; BOOTH, T. H. Improved species climatic profiles, **RIRDC Publication** No 02/095, 2002, 74 p.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

JUERGENS, U. R.; STOBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **European Journal of Medical Research**, v. 3, p. 508–510, 1998a.

_____; STOBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. **European Journal of Medical Research**, v. 3, p. 407–412, 1998b.

JUHÁS, Š.; BUJŇÁKOVÁ, D.; REHÁK, P.; CIKOŠ, Š.; CZIKKOVÁ, S.; VESELÁ, J.; IL'KOVÁ, G.; KOPPEL, J. Anti-inflammatory effects of thyme essential oil in mice. **Acta Veterinaria Brno**, v. 77, p. 327–334, 2008.

KAMATOU, G. P. P.; VAN ZYL, R. L.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; TILNEY, P. M. Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of the essential oils of four related *Salvia* species indigenous to Southern Africa. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 72–79, 2006.

KLEIN, H.; GARNEAU, L.; COADY, M.; LEMAY, G.; LAPOINT, J.Y.; SAUVÉ, R. Molecular characterization of an inwardly rectifying K⁺ channel from HeLa cells. **Journal of Membrane Biology** v. 167. p. 43–52, 1999.

KOKUMAL, M.; KONOSHIMA, T.; KOSUKA, M. Euglobal TI, a new euglobin from *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1082–1086, 1991.

KOO, B.; PARK, K.; HA, J.; PARK, J.; LIM, J.; LEE, D. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 978–982, 2003.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An enzyme-release assay for natural Cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 64, n 3, p. 313–320, 1983.

KOUNINKI, H.; HAUBRUGE, E.; NOUDJOU, F. E.; LOGNAY, G.; MALAISSE, F.; NGASSOUM, M. B.; GOUDOUM, A.; MAPONGMETSEM, P. M.; NGAMO, L. S.; HANCE, T. Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 70, p. 787–792, 2005.

LAHLOU, M.; BERRADA, R. Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. **International Journal of Aromatherapy**, v. 11, p. 87–96, 2001.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, p. 1125–1131, 2002.

_____; INTERAMINENSE, L. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE G. P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 323–330, 2003.

LEE, K. H.; LIN, Y. M.; WU, T. S.; ZHANG, DE C.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I. H.; CHANG, J. J.; WU, R. Y.; YANG, T. H. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. **Planta Medica**, v. 54, n. 4, p. 308-311, 1988.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas – *Myrciaria*, *Pseudocaryophyllus*, *Blepharocalyx*, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 731-876, 1978.

LEITE, A. M.; LIMA, E.; SOUZA, E.; DINIZ, M.; TRAJANO, V.; MEDEIROS, I. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LI, Y.; LI, M.; WANG, L.; JIANG, Z.; LI, W.; LI, H. Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia annul* L. **Journal of West China University of Medical Science**, v. 35, p. 337–339, 2004.

LIMA, E. A. Eucalipto benthamii – uma alternativa energética para áreas de ocorrência de geadas severas. **Painel Florestal**. Disponível em: <
http://painelflorestal.com.br/exibeNews.php?id=410;cod_editoria=4;url_back=news.php;pag=0;busca=> Acesso em: 20 de jul. 2009.

LIN, Z.J.; QIU, S. X.; WUFUER, A.; SHUM, L. Simultaneous determination of glycyrrhizin, a marker component in *Radix glycyrrhizae*, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 201–207, 2005.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 581 –593, 1997.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Effects of an antiinflammatory peptide (antiflammin-2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol drmal application. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 347-353, 1995.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major

constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, p. 1002–1012, 2008.

LORENTE, I.; OCETE, M. A.; ZARZUELO, A.; CABO, M. M.; JIMENEZ, J. Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 2, p. 267-272, 1989.

LUCIA, A.; JUAN, L. W.; ZERBA, E. N.; HARRAND, L.; MARCÓ, M.; MASUH, H. M. Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) **Parasitology Research**, nov, 2011.

_____; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Yield, chemical composition and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. **Entomologia experimentalis et Applicata**, v. 129, p. 107-114, 2008.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 8915–8920, 2001.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat., Myrtaceae**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MANTERO, C.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, P.; ESCUDERO, R.; PRIORE, E.; MENÉNDEZ, P. Potencialidad para producción de aceites esenciales en especies *Eucalyptus* cultivadas en Uruguay. **Agrociencia**, v. 11, n. 2, p. 17-23, 2007.

MARTIN, S.; OCETE, M. A.; GALVEZ, J.; JIMÉNEZ, J.; ZAZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta Medica**, v. 59, p. 533-536, 1993.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 349–355, 1998.

MEDEIROS, K. C. P.; MONTEIRO, J. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SILVA, B. A.; PIUVEZAM, M. R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 23-28, 2007.

MENEZES, I. A. C.; BARRETO, C. M. N.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V.; SOUSA, D. P. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, p. 562-566, 2010.

MERCHANT, D.; KAHN, R.; MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Broken Arrow: Burgess Publishing, 1964.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MILNER, J. A. A historical perspective on garlic and cancer. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1027S–1031S, 2001.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M. Eucalyptone G, a new phloroglucinol derivative and other constituents from *Eucalyptus globulus* Labill. **ARKIVOC**, v. xv, p. 281-291, 2007.

MONZOTE, L.; MONTALVO, A. M.; ALMANONNI, S.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; ABREU, J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. **Chemotherapy**, v. 52, p. 130–136, 2006.

MOON, T.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. **Parasitology Research**, v. 99, p. 722–728, 2006.

MORSE, M.; STONER, G. Cancer chemoprevention: principle and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737–1746, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

MOSSI, A. J.; ASTOLFI, V.; KUBIAK, G.; LERIN, L.; ZANELLA, C.; TONIAZZO, G.; DE OLIVEIRA, H.; TRECHEL, D.; DEVILLA, I. A.; CANSIAN, R.; RESTELLO, R. Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 273-277, 2011.

MOTEKI, H.; HIBASAMI, H.; YAMADA, Y.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KOMIYA, T.; Specific induction of apoptosis by 1, 8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. **Oncology Review**, v. 9, n. 4, p. 757-760, 2002.

MUKHERJEE, P. K.; MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; HOUGHTON, P. J. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 1-28, 2006.

MULDER, T.; VERSPAGET, H. W.; SIER, C.; ROELOFS, H. M. J.; GANESH, S.; GRIFFIOEN, G.; PETERS, W. H. M. Glutathione S-transferase-pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. **Cancer Research**, v. 55, p. 2696–2702, 1995.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

NADERI, G.; ASGARY, S.; ANI, M.; SARRAF-ZADEGAN, N.; SAFARI, M. Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 267, p. 59–66, 2004.

NEVES, A.; ROSA, S.; GONÇALVES, J.; RUFINO, A.; JUDAS, F.; SALGUEIRO, L.; LOPES, M. C.; CAVALEIRO, C.; MENDES, A. F. Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced NF- κ B activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of α -pinene. **Planta Medica**, v. 76, 303-308, 2010.

NICOLETTI, I.; MAGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271–279, 1997.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003, p. 9-56.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B.; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p.67-76, 1998.

NISHIZAWA, M.; EMURA, M.; KAN, Y.; YAMADA, H.; OGAWA, K.; HAMANAKA, N. Macrocyclics: HIV-RTase inhibitors of *Eucalyptus globulus*. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 21, p. 2983-2986, 1992.

NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T. I. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 28, p. 139–146, 1996.

NSW - NATIONAL PARKS & WILDLIFE SERVICE. **Threatened species information: *Eucalyptus benthamii*** Maiden and Cabbage. Hurstville: National Parks & Wildlife Service, 2000. 3 p.

OCAÑA-FUENTES, A.; ARRANZ-GUTIÉRREZ, E.; SEÑORANS, F. J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1568–1575, 2010.

OLIVEIRA, M. M. J. **Atividade antitumoral do álcool e ácido perílico em células de leucemia mielóide crônica e glioblastoma multiforme**. Niterói, 2010, 92 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal Fluminense.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos **Programa de Melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2011. 68 p. (Documentos, 214).

PARIJA, T.; DAS, B. Involvement of YY1 and its correlation with c-myc in NDEA induced hepatocarcinogenesis, its prevention by d-limonene. **Molecular Biology Reports**, v. 30, p. 41–46, 2003.

PARK, H.-M.; KIM, J.; CHANG, K.-S.; KIM, B.-S.; YANG, Y.-J.; KIM, G.-H.; SHIN, S.-C.; PARK, I.-K. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 405-410, 2011.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v. 49, p. 316–323, 2006.

PEREZ R. M. G. Antiviral Activity of Compounds Isolated From Plants **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 2, p. 107–157, 2003.

PHILLIPS, L. R.; MALSPEIS, L.; SUPKO, J. G. Pharmacokinetics of active drug metabolites after oral administration of perillyl alcohol, an investigational antineoplastic agent, to the dog. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, p. 676–680, 1995.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos essenciais**. Viçosa: CPT, manual n° 463, 2003. 140 p.

PONGPRAYOON, U.; SOONTORNSARATUNE, P.; JARIKASEM, S.; SEMATONG, T.; WASUWAT, S.; CLAESON, P. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part I: The essential oil. **Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 319-322, 1997.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998a.

_____. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 243-249, 1998b.

PRYOR, L. D. **Australian endangered species: *Eucalyptus***. Canberra: Commonwealth of Australia, 1981. 139 p.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKETKUMNUEN, U.; NAKAE, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v. 183, p. 9–15, 2002.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

RAJESH, D.; STENZEL, R.; HOWARD, S. Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 35968–35978, 2003.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S.; Cerdá, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, L. *In vivo* activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509-2518, 2000.

RICHTER, C.; SCHLEGEL, J. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. **Toxicology Letters**, v. 67, p. 119–127, 1993.

ROBBERS, J. E.; SPEEDLE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327 p.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 2391–2400, 2004.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1079–1089, 2002.

ROMAN, R. M. **Valor prognóstico da mieloperoxidase na doença arterial coronariana**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROMEILAH, R. M. Anticancer and antioxidant activities of *Matricaria chamomilla* L. and *Marjorana hortensis* essential oils. **Research Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 4, p. 332–339, 2009.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; SOUZA, J. A.; ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2003.

SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G. A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S. Y.; SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 231-233, 2007.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 231-233, 2007.

SCHUMACHER, M. V.; CALIL, F. N.; VOGEL, H. L. M. **Silvicultura aplicada**. Santa Maria: UFSM, 2005, 120 p.

SEFIDKON, F.; BAHMANZADEGAN, A.; ASSAREH, M. H. Effect of distillation methods and harvesting times on the essential oil and cineole content of *Eucalyptus dealbata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 2, p. 250-253, 2008.

SEIDLICH, B.; DOUGLAS, S.; OCULUS, E. J. **A vegetation management plan for the Sydney Region**. Sydney: Sydney Regional Organizations, ANCA, ALGA, 1997, 117 p.

SELLITTI, D. F.; SUZUKI, K.; DOI, S. Q.; LAGRANHA, C.; MACHADO, M.; MATOS, T.; KOHN, L. D. Thyroglobulin increases cell proliferation and suppresses Pax-8 in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 3, p. 795-799, 2001.

SERAFINO, A.; SINIBALDI VALLEBONA, P.; ANDREOLA, F.; ZONFRILLO, M.; MERCURI, L.; FEDERICI, M.; RASI, G.; GARACI, E.; PIERIMARCHI, P. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. **BMC Immunology**, v. 9, p. 1-17, 2008.

SETZER, W. N.; SETZER, M. C.; MORIARITY, D. M.; BATES, R. B.; HABER, W. A. Biological activity of the essential oil of *Myrcianthes* sp. Black fruit from Monteverde, Costa Rica. **Planta Medica**, v. 65, p. 468–469, 1999.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277–283, 2003.

SILVA, P. H. M.; BRITO, J. O.; SILVA JÚNIOR, F. G. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DELMOND, B.; FILLIATRE, C.; BOURGEOIS, G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 1, p. 27-33, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007, p. 467-495.

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Unisinos, 2003.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, H. A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, p. 627–634, 2004.

STRATTON, S.; DORR, R.; ALBERTS, D. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1292–1297, 2000.

SÜNTAR, I.; TUMEN, I.; USTÜN, O.; KELES, H.; KÜPELİ AKKOL, E. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by *in vivo* and *in vitro* experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 533-540, 2012.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.1, p.60-64, 2004.

TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; ETOH, H.; SINGH, I. P.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of euglobal-G1 from leaves of *Eucalyptus grandis*. **Cancer Letters**, v. 155, p. 61–65, 2000.

_____; KONOSHIMA, T.; SHINGU, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A.; KOSUKA, M. Structures of euglobal G1, G2 and G3 from *Eucalyptus grandis*, three new inhibitors of Epstein-Barr virus activation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 1444–1446, 1990.

TALPUR, N.; ECHARD, B.; INGRAM, C.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, p. 193–199, 2005.

TEISSEDRE, P.; WATERHOUSE, A. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3801–3805, 2000.

TEPE, B.; DONMEZ, E.; UNLUB, M.; CANDANC, F.; DAFERERAD D.; VARDAR-UNLUB, G.; POLISSIOUD, M.; SOKMENA, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret *et* Aucher *ex* Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, v. 84, p. 519–525, 2004.

THE MERCK INDEX: **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologycals**, 13 ed., Merck ; Co., Rahway, on CD-ROM Version, 2001.

TIAN, Y.-H.; LIU, X.-M., ZHOU, Y.-H.; QIN, R.-H. Chemical composition of essential oils of leaves from *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus benthamii*. **Jingxi Huagong**, v. 22, n. 12, p. 920-923, 2005.

TOLOZA, A. C.; LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H.; PICOLLO, M. I. Interspecific hybridization of *Eucalyptus* as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7341-7347, 2008.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549–554, 2005.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**. 9^a ed. Philadelphia: Lea ; Febiger, 1988.

USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA). 22. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990.

VERCESI, A. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEINICKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**, v. 17, p. 43–52, 1997.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VIGO E., CEPEDA, A.; GUALILLO, O.; PEREZ-FERNANDEZ, R. J. *In vitro* anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 257–263, 2004.

VIRADOR, V. M.; KOBAYASHI, N.; MATSUNAGA, J.; HEARING, V. J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 207–219, 1999.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. **Cientia Forestalis**, São Paulo, n. 56, p. 145-154, 1999.

_____. **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo: USP/ESALQ, Documentos Florestais nº 17, p. 1-26, 2003.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S.; SHIVJI, G. M.; MAK, T. W.; SAUDER, D. N. CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WATTENBERG, L. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. **Cancer Research**, v. 52, p. 2085s–2091s, 1992.

WEDGE, D. E.; TABANCA, N.; SAMPSON, B. J.; WERLE, C.; DEMIRCI, B.; BASER, K.; NAN, P.; DUAN, J.; LIU, S. Antifungal and insecticidal activity of two *Juniperus* essential oils. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 1, p. 123–127, 2009.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7218–7225, 2010.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013–2025, 2001.

_____; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3–19, 2005.

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.3–4, 2003.

WU, C.-S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, J. J. W.; SHIEH, J.-J.; SHIEH, HUANG, C.-H.; LIN, P.-S.; CHANG, G.-C.; CHANG, J.-T.; LIN, C.-C. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 818261, 13 pages, 2012.

YANG, Y. C.; LEE, H. S.; CLARK, J. M.; AHN, I. J. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2507–2511, 2004.

YASNI, S.; IMAIZUMI, K.; SIN, K.; SUGANO, M.; NONAKA, G. Identification of an active principle in essential oils and hexane-soluble fractions of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. showing triglyceride-lowering action in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 273–278, 1994.

YAZDANPARAST, R.; ALAVI, M.. Antihyperlipidaemic and antihypercholesterolaemic effects of *Anethum graveolens* leaves after the removal of furocoumarins. **Cytobios**, v. 105, p. 185–191, 2001.

YOON, W. J.; MOON, J. Y.; SONG, G.; LEE, Y. K.; HAN, M. S.; LEE, J. S.; IHM, B. S.; LEE, W. J.; LEE, N. H.; HYUN, C. G. *Artemisia fukudo* essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-κB and MAPK activation in RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1222–1229, 2010.

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate and arachidonic acid-induced ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983.

ZAMAI, L.; FALCIERI, E.; MARHEFKA, G.; VITALE, M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. **Cytometry**, v. 23, p. 303-311, 1996.

ZARKOVIC, N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 281–291, 2003.

ZHOU, J. Y.; TANG, F. D.; MAO, G. G.; BIAN, R. L. Effect of α -pinene on nuclear translocation of NF- κ B in THP-1 cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 4, p. 480-484, 2004.

ZÚÑIGA, B.; GUEVARA-FEFER, P.; HERRERA, J.; CONTRERAS, J.; VELASCO, L.; PÉREZ, F.; ESQUIVEL, B. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species. **Planta Medica**, v. 71, n. 9, p. 825–828, 2005.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 482

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.035036/2010-16

APROVADO: 21/09/2010 – R.O. 08/2010

TÍTULO: Óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage (Myrtaceae): atividade anti-inflamatória, ação despigmentante, desenvolvimento de micro/nanopartículas e aplicação em formas farmacêuticas semi-sólidas

AUTORES: Daniela de Almeida Cabriri, Patricia Mathias Dóll Boscardin, Michel F. Ctuki, Arthur da Silveira Prudente, Daniel A.G.B. Mendes

DEPARTAMENTO: Farmacologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEA